



HAL
open science

Epidémiologie et transmission du parasite entérique Blastocystis sp. en Afrique et au Moyen Orient

Salma Khaled

► **To cite this version:**

Salma Khaled. Epidémiologie et transmission du parasite entérique Blastocystis sp. en Afrique et au Moyen Orient. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille; Université Libanaise, 2021. Français. NNT : 2021LILUS021 . tel-03474852

HAL Id: tel-03474852

<https://theses.hal.science/tel-03474852v1>

Submitted on 10 Dec 2021

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.

Thèse en Cotutelle
Pour l'obtention du grade de Docteur délivré par
L'Université de Lille
(Ecole Doctorale Biologie Santé)
Spécialité : Parasitologie (Pharmacie)
et
L'Université Libanaise
(Ecole Doctorale Sciences et Technologie)
Spécialité : Microbiologie alimentaire et médicale

Présentée et soutenue publiquement par
Salma Khaled
Le 21 Mai 2021

Epidémiologie et transmission du parasite entérique
***Blastocystis* sp. en Afrique et au Moyen-Orient**

Membres du jury

- Président :** Pr S. MONCHY (Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux, France)
- Rapporteurs :** Pr A. TOTET (Université de Picardie Jules Vernes, Amiens, France)
Pr H. EL HAJJ (Université Américaine de Beyrouth, Liban)
- Examineurs :** Pr S. MONCHY (Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux, France)
Pr S. TOKAJIAN (Université Libanaise Américaine, Byblos, Liban)
- Directeurs de thèse :** Dr E. VISCOGLIOSI (Institut Pasteur de Lille, France)
Pr F. DABBOUSSI (Université Libanaise, Tripoli, Liban)
- Co-directrice de thèse :** Dr D. EL SAFADI (Université Libanaise, Tripoli, Liban)
- Co-encadrante de thèse :** Dr M. CHABE (Institut Pasteur de Lille, France)

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à adresser mes plus chaleureux remerciements à mon directeur de thèse côté français, le **Dr. Eric Viscogliosi** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour la confiance qu'il m'a accordée en dirigeant cette thèse, pour son encadrement scientifique, ses nombreuses explications, son aide, sa patience et sa grande sympathie ainsi que pour le temps qu'il m'a consacrée pour réaliser ce projet. Merci pour votre patience et pour votre accompagnement pendant ces 3 années de thèse malgré votre lourde responsabilité en tant que directeur d'une équipe de recherche. Les connaissances, le savoir-faire et les conseils que vous m'avez transmis sont et resteront très précieux pour moi. Je suis ravie d'avoir travaillé au sein de votre équipe.

Du côté libanais, mes remerciements s'adressent à mon directeur de thèse, le **Pr. Fouad Dabboussi**. Merci de m'avoir guidée, encouragée, conseillée et soutenue pendant cette thèse. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et pour la confiance que vous m'avez attribuée. Je voudrais aussi exprimer mes remerciements et mon profond respect à mes co-encadrantes de thèse, le **Dr. Dima El Safadi** et le **Dr. Magali Chabé**. J'ai énormément appris grâce à vous. Merci pour l'attention portée à mes travaux, pour vos conseils, votre disponibilité et votre aide scientifique et morale tout le long de ma thèse. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous. Un grand merci.

Je remercie tous les membres du jury pour avoir accepté d'examiner mon travail. Merci à mes rapporteurs, les **Pr. Anne Totet** et **Pr. Hiba El Hajj** et à mes examinateurs, **Pr. Sébastien Monchy** et **Pr. Sima Tokajian** pour l'intérêt porté à ma thèse.

Je tiens à remercier le directeur du Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications (EDST-UL) de Tripoli au Liban, le **Pr. Mohamad Khalil** et le directeur de l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le **Pr. Bernard Sablonnière** pour leur disponibilité.

Je remercie tout particulièrement tous les membres de l'équipe **ECOPHIP de l'Institut Pasteur de Lille** avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Merci pour la création d'un environnement de recherche attrayant et épanouissant. Merci pour tous les sujets intéressants scientifiques et autres, les repas de midi et les pauses café très souvent sources de rires et de bonne humeur.

Je tiens à remercier les libanaises de l'équipe, **Dr. Stéphanie Greige** et **Dr. Martha Baydoun**, pour leurs soutiens affectifs et leurs conseils. Merci pour leurs réconforts dans les moments difficiles. Mes remerciements du fond de mon cœur, ma gratitude et tout le respect vont aussi au **Dr. Sadia Benamrouz** qui n'a jamais hésité à m'aider et a toujours être présente à mes côtés pour me soutenir. Je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi. Merci de

REMERCIEMENTS

savoir faire le bien et de propager une énergie positive autour de toi. Tu resteras toujours une sœur que j'aime beaucoup.

Je remercie également, **Dr. Dionigia Meloni**, la merveilleuse Sarde, je suis heureuse d'avoir partagé des moments inoubliables avec toi et ton fils.

Nausicaa, la personne la plus dynamique, ardente, motivée et travailleuse que j'ai rencontrée. Mes sincères remerciements vont également à toutes les autres personnes de cette équipe (**Gabriela et les autres**) qui ont toujours été présentes pour m'aider surtout dans les moments les plus difficiles. Je ne me suis jamais sentie seule grâce à vous.

Je remercie spécialement ma collègue préférée, la future **Dr. Manasi Sawant**, la copine indienne d'Angéline Jolie. Tu es une fille ambitieuse, sérieuse dans ton travail. Tu étais toujours une source d'inspiration pour moi.

Et je n'oublie pas l'**équipe de Gènes Diffusion « GD »**, (**Christophe, Sophie, Ludivine...**) pour leur disponibilité, leur aide et leur sympathie.

Je voudrais remercier toutes les amies Libanaises que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces trois années à Lille pour leur soutien et leurs encouragements (**Rayane, Thérèse, Bouchra, Chaza, Sylia, Fatima, Salam...**).

Je tiens aussi à mentionner tout le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'**équipe LMSE** du centre AZM de Tripoli et je remercie ici tout particulièrement son directeur le **Pr. Monzer Hamze** ainsi que tous les membres de ce laboratoire. Je leur en suis très reconnaissante.

De tout cœur, j'adresse toute ma ferveur à ma famille, mon idole, la personne la plus chère pour moi: ma mère **Zeynab** ; l'appui et le support de mon père **Mohamad**, de mes frères **Ahmad** et **Houssam**, de ma petite sœur **Chaza**, de ma chère amie et sœur **Nawwar** ainsi que de ma belle-famille. Un remerciement exceptionnel à mon âme, l'amour de ma vie, mon mari **Samer**. Sans toi, rien de cela n'aurait été possible. Ces quelques lignes ne sont pas suffisantes pour t'exprimer ma profonde reconnaissance. Malgré mon éloignement durant mon séjour en France, tu étais toujours là pour moi. Merci pour ta motivation, ton soutien, ton réconfort, tes encouragements pour dépasser les moments difficiles et aller jusqu'au bout. J'espère être toujours à la hauteur de tes attentes.

Enfin cette thèse n'aurait pu être menée sans le soutien financier de l'**Institut Pasteur de Lille**, du **CNRS**, de l'**Inserm**, de l'**Université de Lille**, du **CHRU de Lille**, du **Centre d'Infection et d'Immunité de Lille** et de l'**Université Libanaise** ainsi que l'**association AZM et SAADE** et de l'**association LAsER (Lebanese Association for Scientific Research)** qui ont financé ma bourse doctorale.

RESUME

Blastocystis sp. est un protozoaire entérique parasitant fréquemment l'Homme et de nombreux groupes d'animaux. Malgré son impact majeur en santé publique, encore trop peu de données concernant la prévalence et la distribution des sous-types (STs) de *Blastocystis* sp. sont disponibles dans la littérature pour certaines régions du monde comme l'Afrique et le Moyen-Orient. De plus, sa fréquence importante chez les animaux d'élevage pose naturellement la question de son potentiel zoonotique qui se doit d'être évalué par exemple pour le bétail. Aussi, dans une première étude, *Blastocystis* sp. a été recherché par PCR en temps réel dans un grand nombre d'échantillons de selles collectés au sein d'écoliers sénégalais dans le cadre de ce qui représente la plus large enquête épidémiologique jamais menée en Afrique. La prévalence rapportée atteint les 80% témoignant ainsi d'une circulation très active du parasite dans cette région du globe en lien avec des conditions sanitaires et d'hygiène précaires. Le sous-typage des isolats correspondants par séquençage montre une prédominance du ST2 suivi des ST1, ST3, ST7, ST10 et ST14. C'est la première identification dans la population humaine des ST10 et ST14 qui sont fréquents chez les bovins. Plus globalement, les isolats d'origine animale (ST7, ST10 et ST14) sont en nombre limité en Afrique suggérant un faible risque de transmission zoonotique. L'étude de la diversité génétique intra-ST des ST1, ST2 et ST3 confirme que le ST3 est principalement transmis par voie interhumaine alors que différentes sources de transmission existent pour les ST1 et ST2. Une seconde étude révèle que la prévalence de *Blastocystis* sp. dépasse les 60% dans les élevages de vaches laitières au Nord-Liban. Ces premières données pour ce groupe d'animaux d'importance économique majeure dans ce pays posent la question de l'impact de cette infection dans la filière bovine. Le sous-typage des isolats indique la présence d'une grande variété de STs chez ces animaux couplée à une large prédominance des ST10 et ST14, confirmant que ces deux STs sont bien les STs adaptés aux bovins. La présence des autres STs est probablement liée à des contaminations opportunistes à partir de différentes sources humaines, animales ou environnementales. D'autre part, en comparant la distribution des STs du parasite chez ces animaux avec celle déterminée chez les éleveurs de ces bovins, un risque très limité de transmission zoonotique a pu être mis en évidence. La dernière enquête a quant à elle été conduite dans une cohorte de réfugiés syriens vivant dans plusieurs camps localisés au Nord-Liban. Elle représente la toute première étude portant sur la population syrienne complétant ainsi les données épidémiologiques disponibles pour *Blastocystis* sp. au Moyen-Orient. Dans cette population, la circulation du parasite est là encore très active puisque la prévalence du parasite excède les 60% avec une large prédominance du ST3 suivi du ST1, du

RESUME

ST2 et du ST10 (1 seul isolat). En comparant la prévalence du parasite observée dans les camps avec assainissement avec celle déterminée dans les camps sans assainissement, il est clair qu'un accès difficile à une eau potable et à de bonnes conditions sanitaires et d'hygiène favorise la transmission du parasite. D'autre part, l'analyse comparative de la diversité génétique intra-ST des ST1, ST2 et ST3 des isolats de cette cohorte de réfugiés et de ceux de la population locale du Nord-Liban suggère fortement que *Blastocystis* sp. est principalement transmis par la voie anthroponotique chez les réfugiés et que la circulation du parasite entre ces deux communautés est extrêmement limitée du fait de contacts très restreints. C'est à ce jour la seule étude s'étant intéressée au risque potentiel de transmission de *Blastocystis* sp. à une population locale via une vague de migration.

ABSTRACT

Blastocystis sp. is a frequent enteric protozoon parasitizing humans and numerous groups of animals. Despite its major public health impact, still a little data on the prevalence and subtypes (STs) distribution of *Blastocystis* sp. are available in certain regions of the world such as Africa and the Middle East. Moreover, its significant frequency in domestic animals raises naturally the question of its zoonotic potential, which needs to be assessed in livestock for example. Thus, in a first study, *Blastocystis* sp. was sought by real-time PCR in a large number of feces samples collected from Senegalese schoolchildren as part of what represents the largest epidemiological survey never conducted in Africa. The reported prevalence of the parasite reaches up to 80% in this geographical area of the world indicating its widespread and active circulation in link with precarious sanitary and hygienic conditions in this population. The subtyping of the corresponding isolates by sequencing shows a predominance of ST2 followed by ST1, ST3, ST7, ST10 and ST14. This is the first identification of ST10 and ST14 in the human population, both STs being common in cattle. More globally, there is a limited number of isolates of animal origin (ST7, ST10 and ST14) in Africa highlighting the low risk of zoonotic transmission. The study of the intra-ST genetic diversity of ST1, ST2 and ST3 confirms that ST3 is mainly transmitted by the inter-human route, whereas different sources of transmission exist for ST1 and ST2. A second study shows that the prevalence of *Blastocystis* sp. exceeds 60% in dairy cattle in Northern Lebanon. These first data for this group of animals of major economic importance in this country raise the question about the impact of this infection in the cattle production chain. The subtyping of isolates indicates the presence of a wide variety of STs in livestock coupled with a large predominance of ST10 and ST14, confirming that these two STs represent cattle-adapted STs. The presence of the other STs is probably related to opportunistic contamination from various human, animal, or even environmental sources. On the other hand, by comparing the ST distribution of the parasite in these animals and in-contact dairy farmers, very limited risk of zoonotic transmission has been highlighted. The last survey was conducted in a cohort of Syrian refugees living in several camps in Northern Lebanon. This represents the first study performed in the Syrian population, thus completing the epidemiological data available on *Blastocystis* sp. in the Middle East. In this population, the circulation of the parasite is again very active since the prevalence of *Blastocystis* sp. exceeds 60% with a large predominance of ST3 followed by ST1, ST2 and ST10 (only 1 isolate). By comparing the prevalence of the parasite observed in camps with and without sanitation, it is clear that poor access to safe drinking water, sanitary and hygiene promotion favor the transmission of the parasite. On the other hand, the

ABSTRACT

comparative analysis of the intra-ST genetic diversity of ST1, ST2 and ST3 isolates in this cohort of refugees and the local population in Northern Lebanon strongly suggests that *Blastocystis* sp. is mainly transmitted through the anthroponotic route in refugees and that the circulation of the parasite between these two communities is extremely limited due to very restricted contacts. To date, this is the only study investigating the potential risk of transmission of *Blastocystis* sp. to a local population through a flow of migrants.

COMMUNICATIONS

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

Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese school children

Salma Khaled*, Nausicaa Gantois*, Amadou Tidjani Ly, Simon Senghor, Gaël Even, Ellena Dautel, Romane Dejager, Manasi Sawant, Martha Baydoun, Sadia Benamrouz-Vanneste, Magali Chabé, Seynabou Ndiaye, Anne-Marie Schacht, Gabriela Certad, Gilles Riveau, Eric Viscogliosi

Microorganisms 2020, 8, 1408

* Co-premiers auteurs

First report of prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission risk

Salma Khaled*, Stéphanie Greige*, Dima El Safadi*, Nausica Gantois, Martha Baydoun, Marianne Chemaly, Sadia Benamrouz-Vanneste, Magali Chabé, Marwan Osman, Gabriela Certad, Monzer Hamze, Eric Viscogliosi

Acta Tropica 2019, 194, 23-29

* Co-premiers auteurs

***Blastocystis* sp. prevalence and subtypes distribution amongst Syrian refugee communities living in North Lebanon**

Salma Khaled, Nausica Gantois, Aisha Ayoubi, Gaël Even, Manasi Sawant, Jinane El Houmayraa, Mathieu Nabot, Sadia Benamrouz-Vanneste, Magali Chabé, Gabriela Certad, Dima El Safadi, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze, Eric Viscogliosi

Microorganisms 2021, 9, 184

COMMUNICATIONS

Mon travail de thèse a pour l'instant donné lieu aux communications suivantes dans des séminaires ou des congrès nationaux:

- ✓ « **Ma thèse en 3 minutes** » à l'amphithéâtre de l'Institut de Biologie de Lille le 22 Mai 2018. Poster présenté.
- ✓ 8ème « **Forum doctoral** » à l'Ecole doctorale des sciences et de la technologie de Beyrouth le 19 Septembre 2018. Prévalence, transmission et enzymes nti-oxydantes du parasite entérique *Blastocystis*. **Khaled S**, El Safadi D, Viscogliosi E, Dabboussi F. Présentation Orale.
- ✓ « **Forum doctoral** » à l'Ecole doctorale des sciences et de la technologie de Beyrouth le 26 Juin 2019. Epidémiologie moléculaire du parasite *Blastocystis* sp. au Sénégal. **Khaled S**, El Safadi D, Viscogliosi E, Dabboussi F. Poster présenté.
- ✓ « **Work in progress** » à l'amphithéâtre de l'Institut de Biologie de Lille le 21 Février 2020. Molecular epidemiology and transmission of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. Présentation Orale.

Je tiens aussi à signaler que j'ai obtenu en 2020 une bourse de l'école doctorale Lilloise pour présenter mes travaux à l'**European Multi-colloquium of Parasitology (EMOP 13)** qui devait se tenir à Belgrade en Serbie fin Août 2020. Cependant, du fait de la crise sanitaire, ce congrès a été reporté en Octobre 2021. J'espère ainsi pouvoir y participer avec ce même financement.

FORMATIONS ET ENCADREMENT D'ETUDIANTS

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

- ✓ Atelier « **Droit du travail dans le secteur privé 2ème session** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le 29/05/2018 (8h).
- ✓ Atelier « **Postuler à l'international (CV et lettre de motivation) 2ème session** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le 04/06/2018 (8h).
- ✓ Atelier « **Vendre sa thèse face à un recruteur 2ème session** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le 06/06/2018 (8h).
- ✓ Atelier « **Les docteurs et "l'approche marché" des fonctions publiques 2ème session** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le 25/06/2018 (8h).
- ✓ Atelier « **Arts infographiques** », à l'Agence de la Francophonie (AUF)-Tripoli, du 04/08/2018 au 28/09/2018 (40h).
- ✓ Atelier « **Manager demain : les enjeux de la mixité** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le 26 et 27/02/2019 (16h).
- ✓ Atelier « **Formation initiation à Galaxy** », bilille : plateforme de bioinformatique et bioanalyse de Lille, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq le 28/02/2019 (7h).
- ✓ Atelier « **Analyse ADN** » du cycle d'analyse de données de séquençage à haut débit, bilille : plateforme de bioinformatique et bioanalyse de Lille, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq le 07 et 08/03/2019 (14h).
- ✓ Atelier « **Conférence débat sur l'intégrité scientifique avec le Dr Hervé Maisonneuve** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Amphi fourrier (pole Recherche) le 13/03/2019.
- ✓ Atelier « **Analyse de variants** » du cycle d'analyse de données de séquençage à haut débit, bilille : plateforme de bioinformatique et bioanalyse de Lille, CHU de Lille 01, 02 et 03/04/2019 (21h).
- ✓ Atelier « **Bien gérer ses données de recherche, on s'y met ! 2018/2019** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq le 04 et 25/04/2019 (6h).
- ✓ Atelier « **Métagénomique** » du cycle d'analyse de données de séquençage à haut débit, bilille : plateforme de bioinformatique et bioanalyse de Lille, CHU de Lille le 20, 21 et 22/11/2019 (21h).

FORMATIONS ET ENCADREMENT D'ETUDIANTS

- ✓ Cours « **Caractérisation structurale des macromolécules complexes** », Université Libanaise – Faculté des Sciences section 3 – Master 2 Recherche en Biochimie structurale du 01/11/2017 au 23/12/2017 (21h).
- ✓ Cours « **Membranes biologiques et biomimétismes** », Université Libanaise – Faculté des Sciences section 3 – Master 2 Recherche en Biochimie structurale du 20/10/2017 au 07/12/2017 (28h).
- ✓ Cours « **Approches bioinformatiques appliquées en microbiologie clinique** », Université Libanaise – Faculté de Santé publique section 3 – Master 2 Recherche en Maladies infectieuses du 01/11/2017 au 21/12/2017 (48h).

Durant ma thèse, j'ai aussi eu la possibilité de co-encadrer les travaux de plusieurs étudiants:

- ✓ **Ellena Dautel** (co-encadrement avec Dr. E. Viscogliosi) : étudiante 2^{ème} année BTS Bioanalyse et contrôles, Lycée de l'Escaut, Valenciennes 2018 - 2019. Durée totale du stage: 3 mois.
- ✓ **Juliette Nguyen** (co-encadrement avec Dr. E. Viscogliosi) : étudiante en Master 1 Biologie Santé, Université de Lille 2018 - 2019. Durée totale du stage : 6 semaines
- ✓ **Aicha Al Ayoubi** (co-encadrement avec Dr. D. El Safadi) : étudiante en Master 2 recherche en microbiologie médicale option : Maladies infectieuses, Université Libanaise, Faculté de santé publique section 3 2018 - 2019. Durée totale du stage : 6 mois.
- ✓ **Romane Dejager** (co-encadrement avec Dr. E. Viscogliosi) : étudiante en 2^{ème} année BTS Anabiotec, Lycée de Douai biotech, Douai 2018 – 2019. Durée totale du stage : 3 mois.
- ✓ **Bettina Ram** (co-encadrement avec Dr. E. Viscogliosi) : étudiante en Master 1 Biologie Santé, Université de Lille 2019 – 2020. Durée totale du stage : 2 mois.

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	---

Analyse bibliographique

1. Polymorphisme et cycle biologique de <i>Blastocystis</i> sp.....	3
2. Taxonomie et diversité génétique de <i>Blastocystis</i> sp.	5
3. Méthodes de detection de <i>Blastocystis</i> sp.	9
a. Observation microscopique des selles	10
b. Méthode culturale	10
c. Méthodes moléculaires et sous-typage	11
4. Prévalence de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population humaine.....	12
5. Distribution des STs de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population humaine.	15
6. Distribution des STs de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population animale.....	18
7. Evaluation du potentiel zoonotique de <i>Blastocystis</i> sp.	21
8. Les autres modes de transmission de <i>Blastocystis</i> sp.....	22
9. Impact de <i>Blastocystis</i> sp. en santé humaine et animal.....	24
10. Physiopathologie de <i>Blastocystis</i> sp.....	26
11. Génomique de <i>Blastocystis</i> sp.....	30
12. Traitement de la blastocystose	30

Résultats

1. Epidémiologie moléculaire de <i>Blastocystis</i> sp. chez des écoliers au Sénégal	
a. Contribution de la candidate à l'étude.....	32
b. Résumé de l'étude.....	32
2. Prévalence et distribution des sous-types de <i>Blastocystis</i> sp. chez les vaches laitières au Liban et évaluation de son potentiel zoonotique	

SOMMAIRE

a. Contribution de la candidate à l'étude.....	59
b. Résumé de l'étude.....	59
3. Epidémiologie moléculaire de <i>Blastocystis</i> sp. chez les réfugiés syriens du Nord Liban	
a. Contribution de la candidate à l'étude.....	81
b. Résumé de l'étude.....	81
Discussion	
Situation de la blastocystose au Sénégal et plus globalement en Afrique.....	107
Prévalence et distribution des STs de <i>Blastocystis</i> sp. dans la filière bovine et dans la population humaine au Nord-Liban.....	112
Prévalence et distribution des STs de <i>Blastocystis</i> sp. dans des camps de réfugiés syriens au Nord-Liban.....	115
Conclusion.....	121
Références bibliographiques.....	124

Introduction

INTRODUCTION

A ce jour, et même si leur impact en santé publique reste encore difficile à estimer, les parasitoses intestinales demeurent un véritable fléau puisqu'elles sont répandues mondialement et ont une prévalence grandissante dans de nombreux pays. C'est principalement le cas dans les pays en voie de développement et ce en lien avec une transmission oro-fécale facilitée par des conditions sanitaires et d'hygiène souvent déplorable et un assainissement de l'eau de consommation quasi inexistant. Cette situation favorise une propagation de ces infections parasitaires qui représentent une des principales causes de mortalité principalement par diarrhée, de morbidité et de malnutrition en particulier chez les enfants. En parallèle, les flux actuels de migrants originaires de régions fortement impactées par ces parasitoses vers les pays occidentaux ainsi que les déplacements de populations de pays développés à des fins professionnelles ou récréatives vers des zones géographiques considérées à haut risque d'infection entraînent une recrudescence significative de ce péril fécal.

Parmi les parasites impliqués, les protozoaires occupent une place majeure même s'ils demeurent globalement négligés par les autorités sanitaires. Parmi ces microorganismes, deux d'entre eux, en l'occurrence *Blastocystis* et *Cryptosporidium*, font l'objet de nombreux projets de recherche menés par mon équipe d'accueil en France. En effet, au sein du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), l'équipe Ecologie et Physiopathologie des Protozoaires Intestinaux (ECOPHIP) dirigée par le Dr Eric Viscogliosi, Directeur de Recherche au CNRS, s'intéresse 1) à la prévalence et à la diversité génétique de ces deux parasites dans la population humaine à travers la conduite de larges enquêtes épidémiologiques à travers le monde, 2) aux sources potentielles de transmission animales et environnementales de *Blastocystis* et *Cryptosporidium* à l'Homme et enfin, 3) au pouvoir pathogène de ces microorganismes et aux facteurs de virulence mis en jeu (**Figure 1**). Pour mener à bien ces travaux, l'équipe ECOPHIP développe des modèles d'étude *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* et maîtrise des techniques de pointe dans les domaines de la génomique, de la métagénomique en lien avec l'étude du microbiote de l'hôte, de la transcriptomique et de la protéomique. ECOPHIP adopte une approche intégrative originale et unique en Europe allant de la cellule à la population. Elle combine ainsi « recherche de laboratoire » et « études de terrain » dans de nombreuses zones géographiques via un très large réseau de collaborations faisant ainsi de l'équipe ECOPHIP une référence dans les domaines de la parasitologie et de la protozoologie comme peut en témoigner sa production scientifique (<https://www.ciil.fr/teams/ecology-physiopathology-of-intestinal-protozoa>).

INTRODUCTION

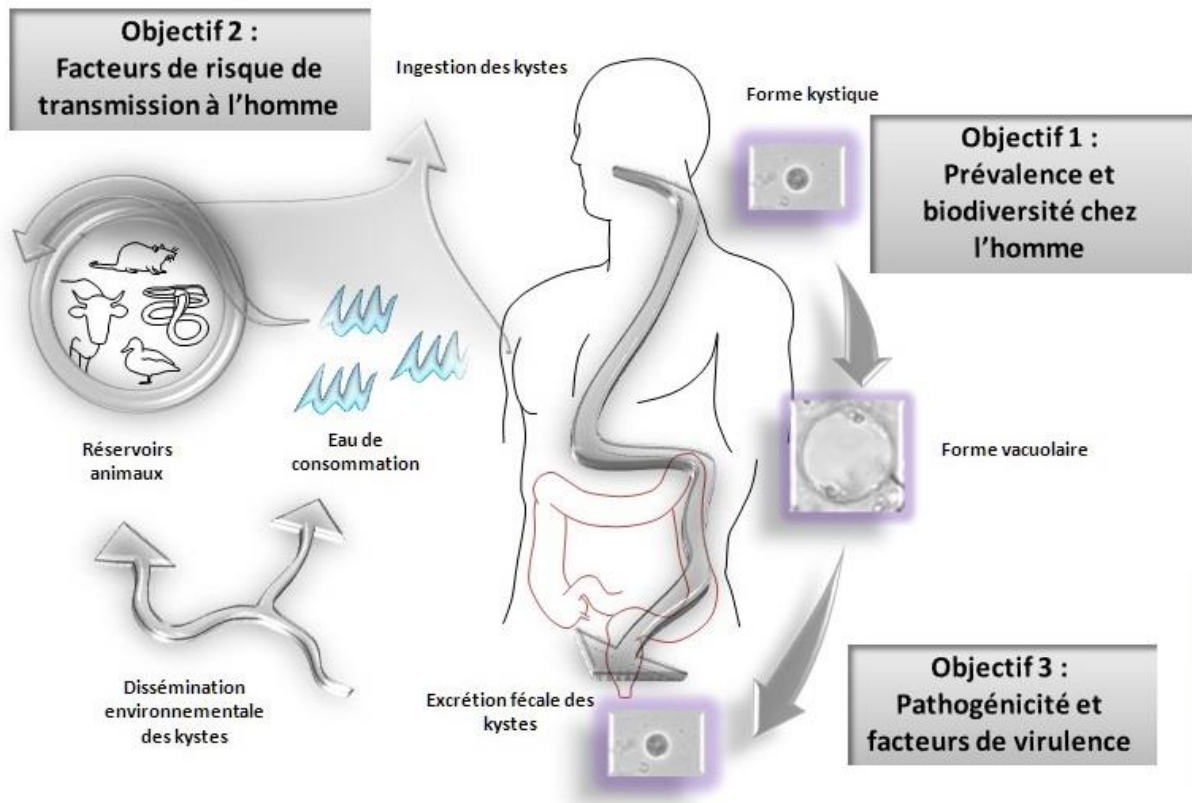


Figure 1 : Représentation schématisée des objectifs de l'équipe ECOPHIP concernant l'étude des protozoaires intestinaux dont *Blastocystis* sp. Les travaux menés durant ma thèse sont en adéquation avec les objectifs 1 et 2 de l'équipe.

Le projet de thèse qui m'a été proposé s'intégrait alors parfaitement aux thématiques de l'équipe ECOPHIP en se focalisant sur l'épidémiologie moléculaire et la circulation de *Blastocystis* sp. au Sénégal et au Liban. En effet, il s'avère que même si l'Afrique et le Moyen-Orient sont des zones géographiques connues pour être largement impactées par les parasitoses intestinales, encore trop peu de données sont finalement, à ce jour, disponibles concernant la prévalence et la diversité génétique de *Blastocystis* sp. dans ces régions du globe. D'autre part, aucune étude portant sur la présence de ce parasite n'avait à notre connaissance été réalisée chez les bovins au Liban alors que ces animaux d'intérêt économique majeur peuvent représenter une source potentielle de contamination pour l'Homme. Les trois enquêtes que j'ai menées dans ma thèse ont donc permis d'obtenir des données précieuses concernant la prévalence du parasite dans les populations sénégalaise,

INTRODUCTION

libanaise et syrienne et de traquer les sources potentielles de contamination pour l'Homme en lien avec le potentiel zoonotique avéré du parasite.

Analyse bibliographique

1. Polymorphisme et cycle biologique de *Blastocystis* sp.

Blastocystis sp. est un protozoaire anaérobie parasitant le tractus intestinal de l'Homme et de très nombreux animaux incluant en particulier, différents groupes de mammifères ainsi que les oiseaux, les reptiles, les amphibiens, les poissons ou bien encore les insectes (Boreham et Stenzel 1993; Cian *et al.* 2017; Gantois *et al.* 2020; Hublin *et al.* 2020; Tan 2004; Yoshikawa *et al.* 2016). L'une des caractéristiques principales de *Blastocystis* sp. réside en son polymorphisme (Stenzel et Boreham 1996; Suresh *et al.* 2009; Tan 2008) puisque 4 formes majeures de ce microorganisme ont pu être décrites dans les selles ou en culture *in vitro*: les formes vacuolaire, granulaire, amiboïde et kystique (**Figure 2**).

Le stade vacuolaire est le plus facilement reconnaissable et le plus fréquemment observé dans les cultures de laboratoire et dans les échantillons de selles. C'est aussi la forme identifiée pour le diagnostic d'une infection à *Blastocystis* sp. Sa taille peut varier de 2 à 200 μm avec un diamètre moyen de 4 à 15 μm . Cette forme est caractérisée par une large vacuole centrale qui aurait un rôle de stockage de glucides et de lipides (Yoshikawa *et al.* 1995) et qui occupe environ 90% du volume de la cellule. Le cytoplasme et les organites comme le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries (MLO pour Mitochondria-Like Organelles) sont ainsi repoussés dans une mince bande périphérique.

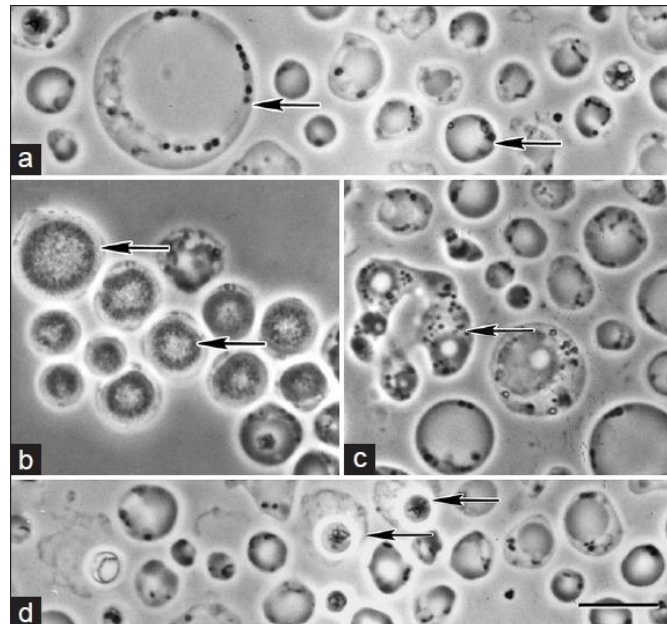


Figure 2: Observation des formes de *Blastocystis* sp. en microscopie en contraste de phase (Tan 2008). (a) Formes vacuolaires, (b) granulaires, (c) amiboïdes et (d) kystiques. Bar = 10 μm .

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Concernant la forme granulaire, la seule différence clairement visible avec la forme vacuolaire est la présence de granules dans le cytoplasme et la vacuole centrale et une taille généralement plus réduite. Pour certains auteurs, cette forme granulaire ne serait pas un stade parasitaire distinct mais plutôt une forme vacuolaire possédant un contenu cellulaire particulier (Stenzel et Boreham 1996). Cette forme est plutôt observée dans les cultures non-axéniques plus anciennes ou traitées avec des antibiotiques (Tan 2008).

Pour ce qui est de la forme amiboïde, elle a quelques fois été identifiée dans des selles diarrhéiques et liquides mais n'a été que rarement observée en culture. D'un diamètre compris entre 3 et 8 μm , sa forme est irrégulière et elle est caractérisée par la présence de pseudopodes tout en étant décrite comme immobile. Elle a été supposée jouer un rôle dans la pathogénie du parasite ce qui reste encore à confirmer (Katsarou-Katsari *et al.* 2008; Tan et Suresh 2006).

La forme kystique souvent ovoïde ou sphérique est quant à elle la plus petite forme décrite du parasite (2 à 5 μm) ce qui peut entraîner une confusion avec des débris fécaux lors de l'observation de selles fraîches. La forme kystique présente une paroi épaisse qui a un rôle protecteur face à des conditions environnementales défavorables. En effet, les kystes de *Blastocystis* sp. peuvent rester viables entre 19 jours et 6 mois dans l'eau à température ambiante et au moins deux mois à 4°C (Moe *et al.* 1996; Suresh *et al.* 2009). Ils sont aussi résistants aux traitements classiques au chlore ou à l'ozone (Khalifa *et al.* 2001; Zaki *et al.* 1996). De nombreuses infections expérimentales réalisées par exemple chez des rongeurs et des oiseaux à l'aide de kystes isolés chez différents groupes d'animaux ont démontré que le kyste représentait bien la forme de résistance et de transmission du parasite (Hussein *et al.* 2008; Iguchi *et al.* 2007, 2009; Suresh *et al.* 2005).

Plusieurs cycles de vie du parasite, parfois contradictoires, ont été proposés par différents auteurs. Néanmoins, en tenant compte des observations morphologiques comme celles démontrant le développement des kystes en formes vacuolaires et inversement (Chen *et al.* 1999; Suresh *et al.* 1993; Villar *et al.* 1998), le cycle de vie le plus probable de *Blastocystis* sp. est celui proposé par Tan (2004, 2008) (**Figure 3**). Brièvement, l'infection débute par l'ingestion par un hôte humain ou animal de la forme kystique présente dans l'environnement. Après excystation, les kystes se transforment en formes vacuolaires dans le gros intestin de l'hôte. Ces formes vacuolaires peuvent se multiplier par fission binaire ou se transformer en formes granulaires ou amiboïdes. Certaines de ces formes vont ensuite s'enkyster lors de la traversée du côlon, conduisant à l'excrétion de kystes dans les selles qui pourront, à leur tour, se disséminer et contaminer un nouvel ou le même hôte. Ainsi *Blastocystis* sp. vit dans des environnements à très faible teneur en oxygène.

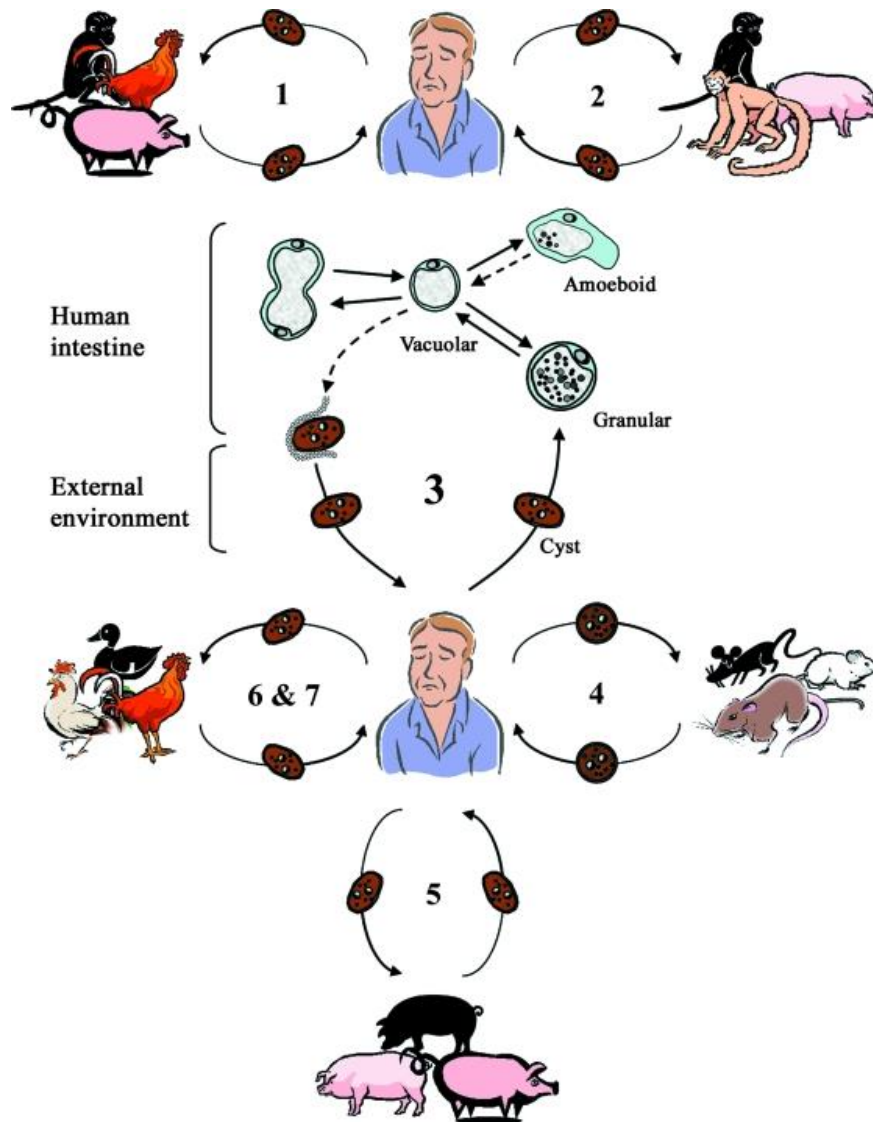


Figure 3: Cycle de vie proposé pour *Blastocystis* sp. (Tan 2008)

Malgré le manque de données concernant le cycle biologique de *Blastocystis* sp., toutes les hypothèses s'accordent à dire que le principal mode de transmission du parasite est la voie féco-orale via principalement la consommation d'eau ou de nourriture contaminées par des kystes (Eroglu and Koltas 2010; Leelayoova *et al.* 2008; Parija et Jeremiah 2013; Tan 2004, 2008).

2. Taxonomie et diversité génétique de *Blastocystis* sp.

La première description et classification cohérente de *Blastocystis* sp. a été publiée en 1911 par Alexeieff. Alors que cet auteur croyait d'abord observer des kystes de flagellés, il a finalement nommé ce micro-organisme *Blastocystis enterocola* et l'a classé comme une

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

levure. Un an plus tard, Brumpt, qui travaillait sur du matériel humain, a modifié le nom de cet unicellulaire en *Blastocystis hominis* (Brumpt 1912). D'autres études basées sur les caractéristiques morphologiques, ultrastructurales et physiologiques ont classé *Blastocystis* comme un protozoaire (Zierdt *et al.* 1967), d'abord dans le groupe des sporozoaires (Zierdt et Tan 1976) puis dans celui des Sarcodina (Zierdt 1991). Plus récemment, des analyses phylogénétiques basées sur la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S ont clairement inclus *Blastocystis* au sein du groupe des Straménopiles (**Figure 4**) (Silberman *et al.* 1996). On peut noter que *Blastocystis* sp. est phylogénétiquement proche de *Proteromonas lacertae*, un endosymbionte flagellé de l'intestin de lézards et d'amphibiens. Ces deux microorganismes ont en commun la capacité de coloniser le tube digestif des vertébrés et de présenter un stade de résistance (kyste) qui est aussi le stade de transmission.

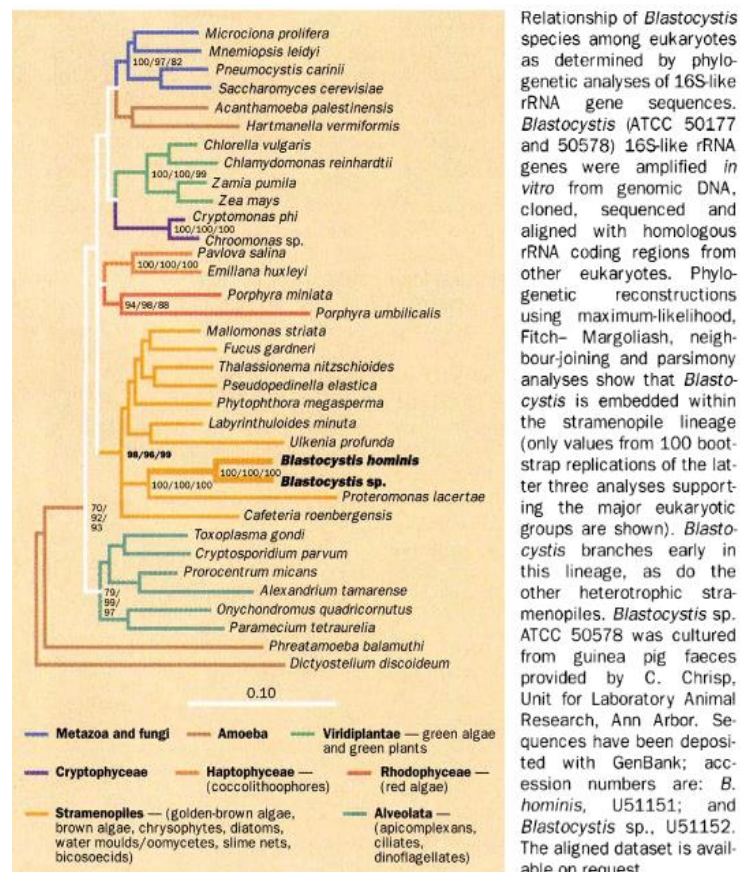


Figure 4 : Relations de parenté du genre *Blastocystis* avec d'autres eucaryotes basées sur la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S (Silberman *et al.* 1996). Les branches orange de l'arbre correspondent aux représentants du groupe des Straménopiles.

Les Straménopiles (ou Heterokonta) sont définis comme un assemblage évolutif complexe et hétérogène qui comprend des protistes unicellulaires et multicellulaires, avec des

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

représentants à la fois hétérotrophes et photosynthétiques (Tan 2004). Il englobe par exemple les algues brunes, les dictyozoaires et les oomycètes qui sont des parasites de plantes. Une nouvelle classe parmi les Straménopiles a été spécialement créée pour *Blastocystis* : la classe des Blastocystea dans le sous-phylum des Opalinata, Infrakingdom Heterokonta, Subkingdom Chromobiota, Kingdom Chromista (Cavalier-Smith 1998). Cette dernière classification permet d'accueillir dans un taxon propre *Blastocystis* qui est le seul Straménopile susceptible d'infecter l'Homme suggérant un processus évolutif récent d'adaptation au parasitisme chez ce micro-organisme.

Le statut d'espèce au sein du genre *Blastocystis* a longtemps été discuté car les isolats retrouvés chez l'Homme comme chez l'animal sont morphologiquement très semblables. Jusqu'à très récemment, le nom d'espèce d'un isolat de *Blastocystis* était donné en fonction de l'hôte chez lequel il avait été isolé. On peut ainsi citer *B. hominis* chez l'Homme, *B. ratti* chez le rat, *B. galli* chez le poulet et *B. pythoni* chez le python (Belova et Kostenko 1990; Chen *et al.* 1997; Singh *et al.* 1996). La diversité génétique de ce protozoaire a ensuite été largement explorée au cours des dernières années. Des différences en termes de caryotypes ont d'abord été observées entre isolats humains (Carbajal *et al.* 1997), suggérant l'existence de plusieurs espèces au sein du genre *Blastocystis* (Singh *et al.* 1996; Teow *et al.* 1991). Puis, avec l'essor de la biologie moléculaire, notamment en se focalisant d'abord sur les approches de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Tan *et al.* 2006; Yoshikawa *et al.* 1998; Yoshikawa *et al.* 2003) ou de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) toutes basées sur l'amplification du gène codant l'ARNr 18S (Böhm-Gloning *et al.* 1997; Hoevers *et al.* 2000), une large diversité génétique fut mise en évidence entre isolats de *Blastocystis* provenant d'hôtes très variés. En outre, une similarité des profils obtenus pour certains isolats humains et animaux fut observée suggérant tout naturellement une faible spécificité d'hôte du parasite. Ce n'est qu'en 2003 que les premières données de séquences du gène de l'ARNr 18S furent obtenues pour un nombre significatif d'isolats humains et animaux (Arisue *et al.* 2003; Noël *et al.* 2003). Elles confirmèrent cette large hétérogénéité moléculaire entre isolats et cette identité de séquence entre isolats provenant d'hôtes différents. En 2005, Noël *et al.* furent les premiers à publier une large analyse phylogénétique du genre *Blastocystis* et à proposer l'existence d'au moins 9 sous-types (STs), chacun d'entre eux pouvant représenter une espèce (**Figure 5**). De plus, certaines séquences d'isolats provenant d'hôtes différents étaient identiques ce qui confirmait pour la première fois le potentiel zoonotique de ce parasite.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

récemment discuté par Stensvold et Clark (2020). En outre, plusieurs autres STs ont été proposés chez les amphibiens, les reptiles, les poissons et les insectes et appelés NMASTs pour Non-Mammalian and Avian STs (Cian *et al.* 2017; Gantois *et al.* 2020; Yoshikawa *et al.* 2016).

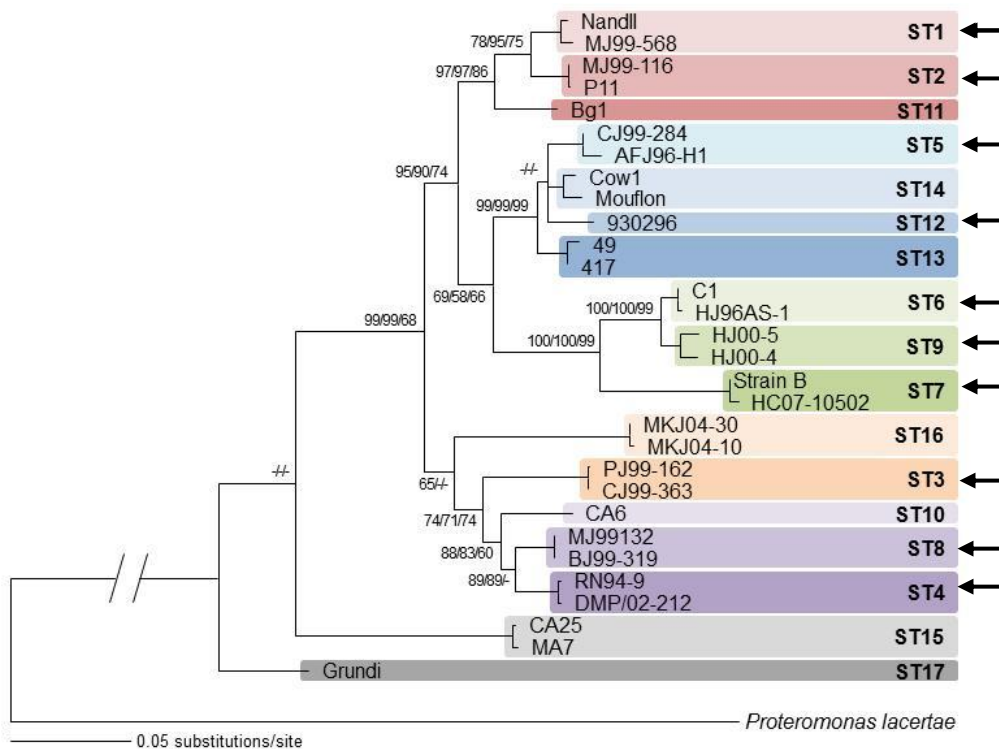


Figure 6: Phylogénie du genre *Blastocystis* établie d'après la comparaison des séquences du gène codant l'ARNr 18S (Cian *et al.* 2016). Les flèches indiquent les 10 STs identifiés chez l'Homme avant cette thèse.

3. Méthodes de détection de *Blastocystis* sp.

Comme pour de nombreux parasites, plusieurs méthodes de détection de *Blastocystis* ont été développées et sont, à ce jour, disponibles avec pour chacune leurs avantages comme leurs inconvénients. Cela englobe l'observation microscopique de selles fraîches avec traitement éventuel de l'échantillon biologique par coloration ou concentration, les méthodes culturales et les méthodes moléculaires suivies éventuellement du sous-typage des isolats. De très nombreuses études ont visé à comparer l'efficacité de ces différentes méthodes de détection (Bart *et al.* 2013; Dogruman-Al *et al.* 2010; Kumarasamy *et al.* 2014; Osman *et al.* 2016; Poirier *et al.* 2011; Roberts *et al.* 2011; Santos et Rivera 2013; Stensvold *et al.* 2007b; Stensvold *et al.* 2012; Tan 2008). Toutes ont clairement démontré la plus grande sensibilité

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

des méthodes moléculaires pour l'identification de *Blastocystis* sp. par rapport aux méthodes morphologiques et culturales.

a. Observation microscopique des selles

Le pouvoir pathogène de *Blastocystis* restant encore controversé, la recherche de ce protozoaire dans les selles n'est donc pas généralisée dans la plupart des laboratoires hospitaliers. En outre, même pour un technicien expérimenté, son polymorphisme rend son identification difficile, ce qui diminue la sensibilité de cette approche analytique. En effet, la forme vacuaire, facilement détectable, n'est pas prédominante dans les selles (Stenzel et Boreham 1991) tandis que la forme kystique dominante est difficilement distinguable des débris de selles (Tan 2004). Malgré tout, en l'absence de tout autre agent diarrhéique, la recherche du parasite peut être réalisée via une observation microscopique directe d'un frottis de selles dilué dans du sérum physiologique à un grossissement x400. Une présence de plus de 5 *Blastocystis* sp. sur un même champ à ce dernier grossissement indique la positivité de l'échantillon analysé (Tan 2004, 2008). Cependant, il est conseillé, comme pour tout autre parasite, d'examiner trois échantillons de selles sur une période de 7 à 10 jours en raison de l'irrégularité de l'excrétion des parasites. Il est possible de précéder cette observation microscopique d'une concentration classique des selles au formol/éther. Cette technique est efficace pour les formes kystiques (Koltas *et al.* 2014) mais pas pour les formes vacuaires qui sont lysées par l'agressivité de ce traitement (Stensvold *et al.* 2006, 2007b; Suresh et Smith 2004). La coloration du frottis fécal peut aussi légèrement améliorer la sensibilité de la méthode d'observation par microscopie notamment en utilisant le trichrome comme agent colorant (Stensvold *et al.* 2007b; Termmathurapoj *et al.* 2004).

b. Méthode culturale

La culture xénique d'un échantillon de selles est une autre méthode non moléculaire qui s'avère nettement plus sensible que l'observation microscopique pour la détection de *Blastocystis* sp. (Stensvold *et al.* 2007b). Cette mise en culture est réalisée en anaérobiose dans du milieu de Jones pendant 24 à 72 heures (Leelayoova *et al.* 2002; Stensvold *et al.* 2007b; Suresh et Smith 2004; Termmathurapoj *et al.* 2004). Néanmoins, cette méthode reste trop chronophage si on souhaite l'utiliser dans le cadre d'études épidémiologiques à grande échelle. De plus, certains STs de *Blastocystis* présentent un taux de croissance lent dans ces

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

conditions de culture ou sont même incapables d'être cultivés (Stensvold *et al.* 2007b). De ce fait, dans les cas d'infections mixtes c'est-à-dire la présence simultanée d'au moins deux STs différents dans un même échantillon, la croissance d'un ST particulier peut être favorisée par rapport à celle d'un autre ST (Parkar *et al.* 2007; Roberts *et al.* 2013; Yan *et al.* 2007). Il est donc clair que ces déficiences pourront fausser les résultats de prévalence obtenus par cette approche de détection.

c. Méthodes moléculaires et sous-typage

Depuis quelques décennies, le gène codant l'ARNr 18S est une cible privilégiée pour la détection de *Blastocystis* sp. par des approches moléculaires. Ce fut le cas des méthodes RFLP et RAPD développées pour la détection de ce parasite (Böhm-Gloning *et al.* 1997; Hisao et Ayako 1996; Tan *et al.* 2006; Yoshikawa *et al.* 2004b; Yoshikawa et Hayakawa 1996) même si ces approches ne sont maintenant que rarement utilisées puisqu'elles ne fournissent pas de données de séquences. Brièvement, la méthode RAPD se base sur l'utilisation de plusieurs couples d'amorces dont chacun est spécifique d'un ST donné. A ce jour, seuls 7 des 17 STs connus peuvent être identifiés par RAPD ce qui représente un inconvénient majeur même si cette méthode permet éventuellement de détecter les infections mixtes dans un échantillon (Scanlan *et al.* 2015).

Très vite ont ensuite été développées plusieurs approches utilisant tout d'abord la PCR en point final pour identifier *Blastocystis* sp. Pour se faire, plusieurs couples d'amorces spécifiques du genre *Blastocystis* ont été décrits ciblant différents domaines du gène codant l'ARNr 18S et amplifiant ainsi une région commune à tous les STs connus du parasite (Clark *et al.* 2013) (**Figure 7**).

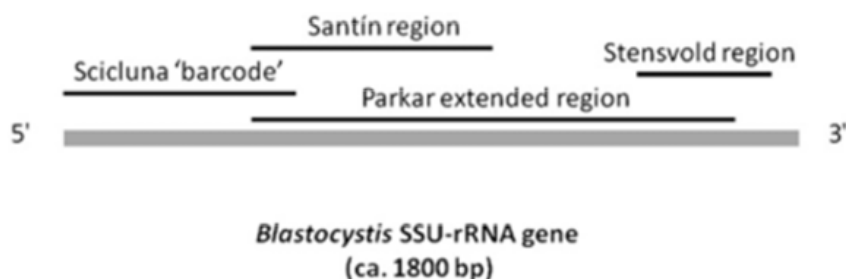


Figure 7: Représentation schématique du gène codant l'ARNr 18S de *Blastocystis* sp. Les régions de ce gène utilisées dans différentes études pour l'identification et le sous-typage des

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

isolats sont indiquées (Parkar *et al.* 2010; Santín *et al.* 2011; Scicluna *et al.* 2006; Stensvold *et al.* 2006).

Pour augmenter la sensibilité de détection du parasite tout en ciblant le même gène, des approches par PCR en temps réel ont par la suite été développées. La première qui est de loin la plus utilisée actuellement dans le cadre de larges études épidémiologiques (Cian *et al.* 2017; El Safadi *et al.* 2016; Greige *et al.* 2018) est celle publiée par Poirier *et al.* (2011) basée sur la technologie SYBR Green. Brièvement, cette approche amplifie un fragment d'environ 350 pb du gène de l'ARNr 18S qui peut ensuite être purifié et séquencé. Cela permet non seulement de vérifier que la séquence obtenue est bien celle de *Blastocystis* sp. mais aussi de déterminer le ST présent dans l'échantillon. En effet, la séquence obtenue peut être aisément comparée aux séquences homologues de STs connus disponibles dans les bases de données. L'attribution d'un isolat à un ST donné nécessite une identité de séquence du domaine comparé équivalant ou dépassant les 96% (Stensvold et Clark 2020). Une valeur inférieure à 96% peut signifier que la séquence obtenue est représentative d'un nouveau ST. Dans ce cas, cela doit être confirmé par l'obtention de la séquence complète du gène de l'ARNr 18S de l'isolat correspondant suivie de son intégration dans une large analyse phylogénétique. Cette technique permet aussi de détecter les infections mixtes puisque celles-ci apparaîtront après séquençage comme des doubles traces sur les chromatogrammes. Par contre, l'identification des STs impliqués n'est que très rarement réalisée. En effet, il est nécessaire pour cela de cloner le produit de PCR et de séquencer un certain nombre de clones (Meloni *et al.* 2012) ce qui représente un coût non négligeable en particulier dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques à grande échelle. La seconde approche par PCR en temps réel utilise quant à elle la technologie TaqMan avec une sonde contrôle interne (Stensvold *et al.* 2012). Elle a l'inconvénient majeur de ne pas permettre le séquençage des produits d'amplification obtenus et donc le sous-typage des isolats correspondants. A noter aussi le développement encore en cours d'une approche PCR multiplex qui à ce jour permet la détection simultanée de 9 STs différents sans fournir de données de séquence (Yoshikawa et Iwamasa 2016).

4. Prévalence de *Blastocystis* sp. dans la population humaine.

Devant l'intérêt majeur de la communauté scientifique pour *Blastocystis* sp., un nombre croissant d'enquêtes épidémiologiques ont été menées depuis plusieurs années dans toutes les régions du globe soulignant ainsi la répartition mondiale de ce parasite. Il m'est donc

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

naturellement impossible dans ce mémoire de résumer toutes ces études. Cependant, plusieurs revues ont tenté de regrouper les données de prévalence obtenues dans de nombreux pays (Stenzel et Boreham 1996; Tan 2008). D'autre part, on sait que les méthodes non moléculaires sous-estiment largement la prévalence de ce parasite (Poirier *et al.* 2011; Stensvold 2013). En effet, ces méthodes sont très dépendantes de plusieurs paramètres comme l'expérience de l'observateur dans l'identification ou la qualité des échantillons analysés. Un exemple très révélateur est par exemple la différence très significative de prévalence observée entre différentes cohortes d'arborigènes malaisiens puisque comprise entre 3,9 et 52,3% (Noor Azian *et al.* 2007; Sinniah *et al.* 2012). Cette différence importante peut très difficilement s'expliquer par de simples variations de composition des cohortes, de région ou de sources d'infection. Par conséquent, seules les données de prévalence obtenues par des méthodes moléculaires seront mentionnées et analysées dans ce mémoire.

Globalement et avant de détailler les données par région géographique, il est important de signaler que la prévalence de *Blastocystis* sp. est plus importante dans les pays en voie de développement en lien avec le péril fécal que dans les pays développés (Stenzel et Boreham 1996; Tan 2008). Si, dans un premier temps, on se focalise sur les pays asiatiques, on peut citer la faible prévalence déterminée dans des zones très urbaines comme à Singapour (3,3%) (Wong *et al.* 2008) ou en Corée du Sud (9%) (Kim *et al.* 2020) alors qu'elle est par exemple de 25% dans une zone rurale aux Philippines (Santos et Rivera 2013). En Thaïlande, une prévalence assez similaire (23 à 40,6%) a été observée entre populations de différents villages (Popruk *et al.* 2015; Srichaipon *et al.* 2019; Thathaisong *et al.* 2013; Yowang *et al.* 2018). C'est aussi le cas au Népal où la prévalence déterminée dans la population totale (26,1%) (Lee *et al.* 2012a) est extrêmement proche de celle observée chez les enfants (24,4%) (Yoshikawa *et al.* 2009). Par contre en Chine, cette prévalence est très fluctuante d'une région à l'autre puisque comprise entre 1,9 et 32,6% en lien principalement avec des conditions climatiques et socio-économiques différentes (Deng *et al.* 2019, 2020; Li *et al.* 2007a,b; Ning *et al.* 2020; Qi *et al.* 2020). Une dernière enquête réalisée en Malaisie a révélé une prévalence de 40% dans une communauté autochtone (Noradilah *et al.* 2017).

Pour ce qui est du continent européen, le nombre d'études reste curieusement encore très limité concernant *Blastocystis* sp. Cette prévalence est de l'ordre de 5% chez des enfants irlandais (Scanlan *et al.* 2018) et de 13% chez des enfants scolarisés en Espagne (Muadica *et al.* 2020). Chez les adultes, elle est de 7,6 à 14,9% en Italie (Beghini *et al.* 2017; Gabrielli *et al.* 2020), de 10,5 à 16% en France (Cian *et al.* 2016; Menu *et al.* 2019; Poirier *et al.* 2011) et de 24% au Danemark (Stensvold *et al.* 2007b) et en République Tchèque (Lhotská *et al.*

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2020). Aux Pays-Bas, deux études conduites à Amsterdam ont montré des prévalences de 24,2% dans la population globale (Bart *et al.* 2013) et de 43% dans une cohorte d'écoliers (Maas *et al.* 2014).

En Amérique du Nord, 7% des individus testés dans une enquête aux Etats-Unis étaient positifs pour *Blastocystis* sp. (Scanlan *et al.* 2016) alors qu'au Mexique cette prévalence approchait les 70% (Rojas-Velázquez *et al.* 2019). En Amérique centrale, une étude menée au Panama sur des enfants scolarisés indiquait que 74,2% d'entre eux étaient infectés par ce parasite (Perea *et al.* 2020). En Amérique du Sud, le taux d'infection à *Blastocystis* sp. dans une zone rurale de Colombie était de 45% chez des adultes (Ramírez *et al.* 2014). Dans ce même pays, elle était par contre de 88,7% au niveau du bassin amazonien (Sánchez *et al.* 2017), de 39,2% dans la région de Cauca dans le sud-ouest (Villamizar *et al.* 2019) et de 51,8% dans une étude multicentrique (Higuera *et al.* 2020). Au Brésil, cette prévalence était de 21% dans une communauté indigène (Malheiros *et al.* 2011) et dépassait les 50% dans des régions rurales des états de Rio de Janeiro (Barbosa *et al.* 2018) et de Sao Paulo (David *et al.* 2015). En Océanie, les seules études menées l'ont été en Australie dans la région de Sydney avec des prévalences observées de 19% dans la population totale (Roberts *et al.* 2013) et de plus de 80% chez des fermiers du Queensland (Wang *et al.* 2014).

Même si le continent africain est, pour des raisons évidentes de conditions sanitaires et d'hygiène précaires, une région du globe à haut risque d'infection par les parasites intestinaux, peu d'enquêtes ont pourtant été menées concernant l'impact de *Blastocystis* sp. En Afrique du Nord, la seule donnée de prévalence concerne la Libye avec une prévalence de 28% (Alfellani *et al.* 2013a). Pour ce qui est de l'Afrique centrale, elle est finalement assez faible en Angola puisque de l'ordre de 25,6% (Dacal *et al.* 2018) mais très importante au Cameroun avec une prévalence approchant les 90% (Lokmer *et al.*, 2019). En Afrique de l'Est, trois études ont été réalisées en Tanzanie montrant des prévalences respectivement de 55,6% (Beghini *et al.* 2017), de 60,9% (Forsell *et al.* 2016) et de 81,5% (Lokmer *et al.*, 2019). En Afrique australe, une seule étude très récente a été publiée à Madagascar montrant une prévalence du parasite d'environ 65% (Greigert *et al.* 2018).

Pour ce qui est de la région qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette thèse en l'occurrence l'Afrique de l'Ouest, plusieurs enquêtes ont été réalisées dans différents pays comme la Côte d'Ivoire avec des prévalences de 58,2% (D'Alfonso *et al.* 2017) et de 70% (Iebba *et al.* 2016), le Nigeria avec des prévalences de 49% (Alfellani *et al.* 2013a) et de 84% (Poulsen *et al.* 2016), le Libéria avec une prévalence de l'ordre de 70% (Alfellani *et al.*, 2013a) et le Mali avec une prévalence voisine de 50% (Kodio *et al.* 2019).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

D'autre part, une première étude menée par mon équipe d'accueil au Sénégal avait montré une prévalence de 100% dans une cohorte limitée composée d'une centaine d'enfants vivant dans le district de Podor situé au Nord Est du pays (El Safadi *et al.* 2014). Toutes ces données montrent clairement une prévalence importante du parasite en Afrique puisque celle-ci dépasse largement en moyenne les 50% dans de nombreux pays alors que pour comparaison, elle n'excède généralement pas les 20% en Europe et en particulier en France (Poirier *et al.* 2011 ; Cian *et al.* 2016).

Concernant le Moyen Orient et la péninsule arabique, les données épidémiologiques sont encore plus limitées que pour l'Afrique. Le peu d'études menées l'ont été en Arabie Saoudite avec une prévalence limitée de l'ordre de 10,5% (Mohamed *et al.* 2017) et en Iran avec une fréquence de 6,5% (Badparva *et al.* 2014). Deux autres enquêtes ont été conduites au Qatar (Abu-Madi *et al.* 2015) et aux Emirats Arabes Unis (AbuOdeh *et al.* 2016) mais elles ne peuvent pas être prises en compte car elles ne concernaient pas la population locale puisqu'elles se focalisaient sur des cohortes de travailleurs migrants originaires d'Afrique et d'Asie. C'est donc finalement au Liban que la situation vis-à-vis de ce parasite est la mieux connue. En effet, une première étude a révélé une prévalence de 63% dans une cohorte d'écoliers de Tripoli au Nord-Liban (Osman *et al.* 2016). Elle était du même ordre de grandeur dans une seconde étude, toujours au Nord-Liban, incluant une cohorte d'individus travaillant dans des abattoirs de poulets (54%) et un groupe de patients hospitalisés pour différentes pathologies dans un hôpital de Tripoli (56%) (Greige *et al.* 2018).

5. Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine.

Comme rappelé précédemment, 17 STs de *Blastocystis* ont été à ce jour décrits chez les mammifères et les oiseaux et d'autres seront très probablement validés dans les années qui viennent.

On note tout d'abord que 10 de ces 17 STs en l'occurrence ST1 à ST9 et ST12 ont été à ce jour identifiés chez l'Homme et ce avec des fréquences variables (**Figure 8**) (Alfellani *et al.* 2013a ; Ramirez *et al.* 2016 ; Stensvold et Clark 2016). La distribution de ces différents STs dans la population humaine et par région géographique a déjà été décrite dans plusieurs revues (Alfellani *et al.* 2013a; Cian *et al.* 2016; Clark *et al.* 2013; Deng *et al.* 2019; Jiménez *et al.* 2019; Ning *et al.* 2020; Stensvold et Clark 2016; Tan 2008).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

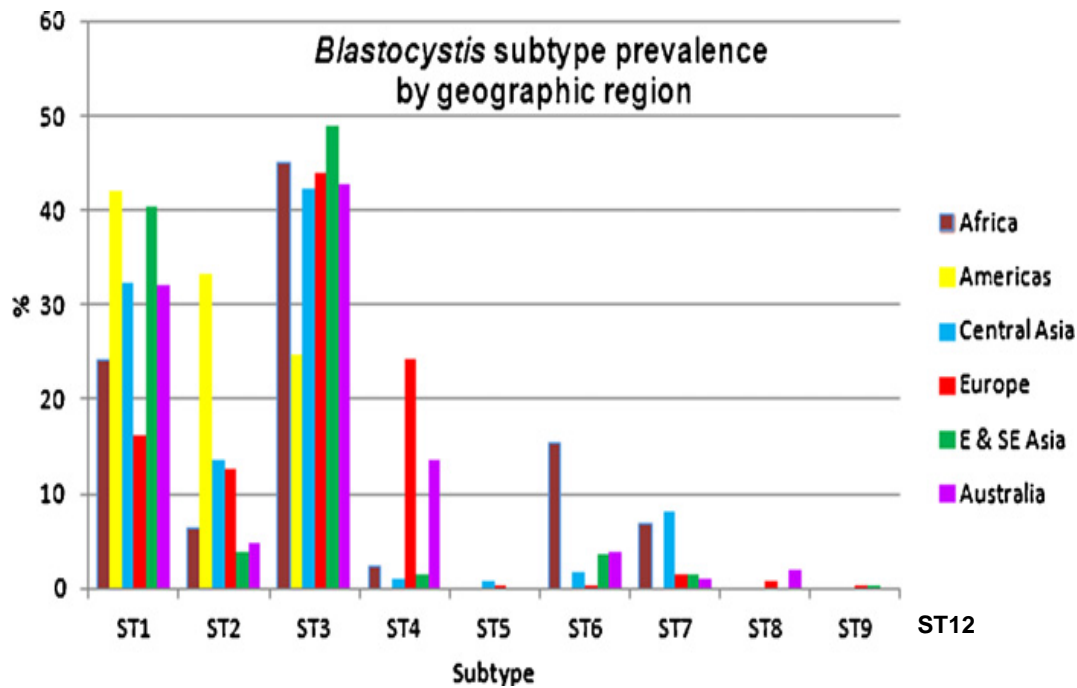


Figure 8: Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine par régions géographiques (Alfellani *et al.* 2013a).

Dans une synthèse publiée par Stensvold et Clark (2016) (**Figure 9**), ces auteurs ont montré que 95% des 3200 isolats sous-typés en date de la publication de cette étude appartenaient aux ST1, ST2, ST3 et ST4 avec une nette prédominance du ST3. Même si, comme nous le verrons plus loin, ces STs peuvent être retrouvés chez les animaux, leur prédominance dans la population humaine peut naturellement s'expliquer par une large transmission-interhumaine. Concernant le ST4, on note une forte variation de sa prévalence selon les régions géographiques. En effet, les isolats de ST4 comptent en 2016 pour plus de 20% des isolats sous-typés en Europe et pour seulement 2% dans le reste du monde. Cette forte fréquence du ST4 en Europe a par la suite été confirmée dans plusieurs études récentes (Beghini *et al.* 2017; Kaczmarek *et al.* 2017; Lhotská *et al.* 2020). Pour expliquer cette différence de prévalence du ST4 entre régions du globe, Clark *et al.* (2013) ont suggéré une émergence récente du ST4 en Europe. Cette émergence pourrait avoir une origine zoonotique (rongeurs probablement) qui reste encore à confirmer.

Comme indiqué sur les **Figures 8 et 9**, les autres STs (ST5, ST6, ST7, ST8 et ST12) identifiés chez l'Homme ne montrent que de faibles prévalences. Ces différents STs comme détaillé ci-dessous sont considérés d'origine animale et de ce fait seraient le résultat d'une transmission zoonotique.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

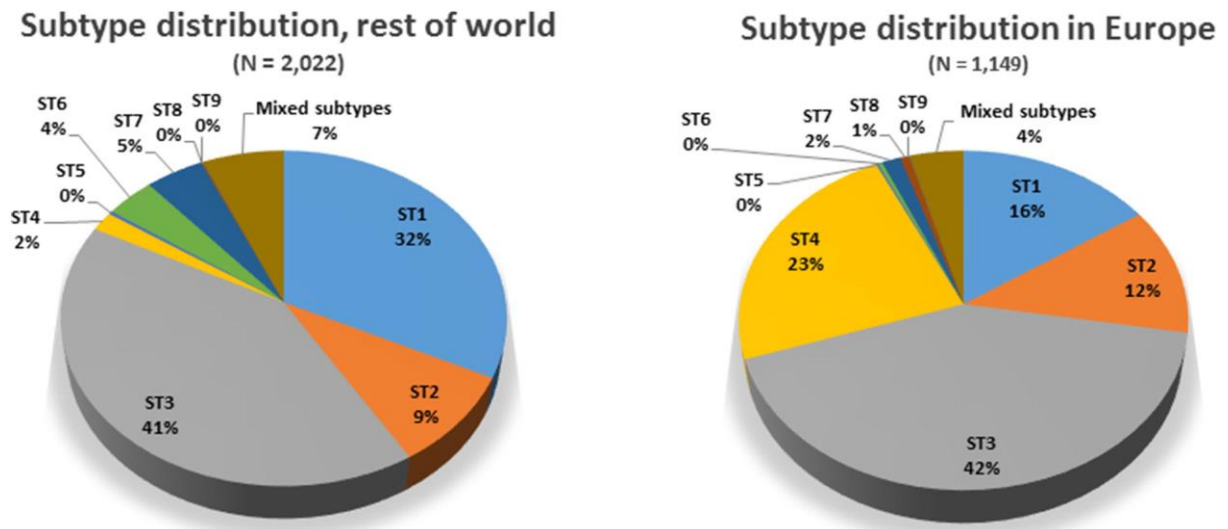


Figure 9: Nouvelle synthèse de la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine (Stensvold et Clark 2016). Le camembert de droite représente la distribution des STs dans la population européenne et celui de gauche dans le reste du monde.

Si on synthétise brièvement les données concernant la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans les zones géographiques qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse en l'occurrence l'Afrique, on constate que le ST3 est globalement prédominant en Afrique du Nord comme par exemple en Tunisie (Ben Abda *et al.* 2017) et en Egypte (El Deeb et Khodeer 2013; Fouad *et al.* 2011; Hameed *et al.* 2011). C'est aussi le cas en Afrique centrale comme en Angola et au Cameroun (Dacal *et al.* 2018 ; Lokmer *et al.* 2019). Par contre, en Afrique de l'Est, le ST2 est prédominant en particulier en Tanzanie (Beghini *et al.* 2017 ; Lokmer *et al.* 2019) alors que c'est le cas du ST1 en Afrique australe (Greigert *et al.* 2018) et dans une majorité de pays d'Afrique de l'Ouest comme le Nigéria (Poulsen *et al.* 2016) et la Côte d'Ivoire (D'Alfonso *et al.* 2017). Il faut cependant indiquer que ces prédominances ne sont pour l'instant que des tendances basées généralement sur un nombre encore restreint d'échantillons pour certains pays. De plus, on peut observer des différences assez significatives dans la distribution des STs au sein d'un même pays comme par exemple en Tanzanie (ST1 ou ST2 prédominant selon les études) (Beghini *et al.* 2017 ; Forsell *et al.* 2016) qui peuvent certainement s'expliquer par des sources de transmission différentes du parasite. Pour ce qui est des autres STs, quelques isolats de ST4 ont été identifiés essentiellement en Afrique de l'Ouest (Alfellani *et al.* 2013a ; El Safadi *et al.* 2014) et un nombre plus important d'isolats de ST6 et ST7 majoritairement en Egypte (Fouad *et al.* 2011 ; Hussein *et al.* 2008).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Au Moyen-Orient et dans la péninsule arabique, la distribution des STs dans cette zone géographique est généralement très similaire à celle observée dans d'autres régions du globe, avec une prédominance du ST3 suivi du ST1 ou du ST2 couplée à l'absence d'autres STs. C'est le cas en Arabie Saoudite (Mohamed *et al.* 2017) et en Iran (Jalallou *et al.* 2017; Salehi *et al.* 2017). D'autres enquêtes ont identifié des cas sporadiques d'infections par le ST4, le ST6 et/ou le ST7 en Iran (Khademvatan *et al.* 2017; Rezaei Riabi *et al.* 2018). Dans le cas particulier du Liban, les premières données de sous-typage des isolats de *Blastocystis* sp. ont été obtenues en 2013 dans la région de Tripoli avec une répartition similaire des 3 STs principaux (ST1 30,6%, ST2 33,3% et ST3 33,3%) et un cas d'infection par le ST4 (El Safadi *et al.* 2013). Une seconde enquête réalisée sur 249 écoliers de Tripoli n'a identifié que les ST1 à ST3 avec une prédominance du ST3 suivi du ST2 et du ST1 (Osman *et al.* 2016). Plus récemment, une étude a englobé deux cohortes dans cette même région (Greige *et al.* 2018). Dans la première composée de patients hospitalisés, le ST3 était largement prédominant suivi du ST2 et du ST1. Par contre, dans une cohorte d'employés d'abattoirs de poulets, le ST3 restait prédominant mais suivi du ST1 et du ST2. De plus, une faible proportion d'isolats appartenait au ST6.

6. Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population animale

Au travers des nombreuses enquêtes menées chez des animaux sauvages, domestiques ou en captivité, il a été montré que *Blastocystis* sp. est capable de coloniser de nombreux groupes d'animaux. Il a ainsi été identifié chez les mammifères comme les primates, les artiodactyles, les proboscidiens, les perissodactyles, les carnivores, les rongeurs et les chiroptères, ainsi que chez les oiseaux, les marsupiaux, les poissons, les amphibiens et les insectes comme détaillé dans plusieurs articles et revues publiés au cours des 25 dernières années (Alfellani *et al.* 2013b,c; Boreham et Stenzel 1993; Cian *et al.* 2017; Gantois *et al.* 2020; Hublin *et al.* 2020; Ning *et al.* 2020; Stenzel et Boreham 1996; Tan 2004, 2008; Yoshikawa *et al.* 2016; Zanetti *et al.* 2020). Une étude à grande échelle dans deux zoos français a par exemple été conduite sur 160 espèces différentes (Cian *et al.* 2017) et a révélé que près de 40% des espèces testées étaient colonisées par *Blastocystis* sp., témoignant ainsi de l'ubiquité de ce parasite dans le monde animal.

Vu le nombre d'études publiées dans ce domaine, nous avons décidé, afin de présenter les données de prévalence et de sous-typage par groupe d'animaux, de nous focaliser principalement sur deux revues de synthèse publiées récemment, en l'occurrence celles de

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Cian *et al.* (2017) et de Hublin *et al.* (2020). Concernant d'abord les primates, *Blastocystis* sp. a été identifié dans plus de 75 espèces différentes de singes. Sa prévalence est extrêmement importante puisqu'elle peut par exemple, dépasser les 80% dans une étude menée en Italie (Zanzani *et al.* 2016), les 60% en Equateur (Helenbrook *et al.* 2015), les 50% en Tanzanie (Kalousová *et al.* 2014) et les 30% en Chine (Ma *et al.* 2020). D'après les synthèses citées ci-dessus, 13 STs différents ont été identifiés chez ce groupe d'animaux avec une très large majorité d'isolats appartenant aux ST1 à ST3 et à un degré moindre au ST8. Du fait du lien de parenté évolutive entre l'Homme et le singe, il n'est sans doute pas étonnant que les ST1 à ST3 soient majoritaires dans la population humaine comme chez les primates non humains. Pour ce qui est du ST8, il est probablement spécifique des primates (Helenbrook *et al.* 2015) même s'il a aussi été détecté chez quelques marsupiaux (Ramírez *et al.* 2014).

Le second groupe est celui des carnivores qui regroupe en particulier les animaux domestiques tels que les chats et les chiens. Ce groupe montre une prévalence beaucoup moins importante que celle observée chez les primates, ce qui exclut a priori l'hypothèse qu'il soit un hôte naturel du parasite (Osman *et al.* 2015; Ruaux et Stang 2014; Wang *et al.* 2013). Cela est confirmé par l'analyse de la distribution des STs identifiés chez ce groupe d'animaux. En effet, aucun ST particulier semble spécifique des carnivores et les isolats identifiés chez ces animaux sont majoritairement de ST1 à ST3 comme dans la population humaine suggérant ainsi une exposition à des matières fécales humaines ou d'autres animaux dans l'environnement et donc un passage possible de l'Homme à l'animal.

En ce qui concerne d'autres groupes de mammifères comme les Perissodactyla, les Proboscidea, les Chiroptera et les Marsupiaux, le nombre encore limité de données épidémiologiques ne permet pas d'avoir une idée claire de la prévalence et de la distribution des STs du parasite. Par contre, concernant le groupe des rongeurs, le ST4 semble être un ST prédominant chez ce groupe d'animaux (Chai *et al.* 2020; Katsumata *et al.* 2018).

Toujours chez les mammifères, les Artiodactyles attirent toute notre attention dans cette thèse et en particulier les bovidae. Dans cette famille, la prévalence de *Blastocystis* sp. peut être extrêmement variable puisque comprise entre 1,8% en Espagne (Quilez *et al.* 1995) et 100% en Indonésie (Suwanti *et al.* 2020). Elle est aussi par exemple comprise entre 3 et 20% aux Etats-Unis (Fayer *et al.* 2012; Maloney *et al.* 2019) et entre 50 et 70% au Japon (Abe *et al.* 2002; Masuda *et al.* 2018) sans dépasser les 10% en Corée du Sud (Lee *et al.* 2018) ou en Chine (Wang *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2017). De nombreux paramètres peuvent expliquer ces variations comme la zone géographique, l'âge ou le sexe des animaux, le type d'élevage (intensif ou en plein air) ou selon que l'on s'adresse à des vaches laitières ou à viande. Sur un

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

plan génotypage, pas moins de 16 STs ont été décrits chez les bovins mais avec une plus forte présence des ST10 et ST14 qui ont été proposés comme étant adaptés aux bovins et qui de plus n'ont encore jamais été trouvés dans la population humaine. Il est à noter que *Blastocystis* sp. peut aussi être très fréquent chez les petits ruminants comme les chèvres et les moutons (de 30 à 95% de prévalence) (Song *et al.* 2017; Tan *et al.* 2013; Udonsom *et al.* 2018). Chez ces animaux, plusieurs STs ont été identifiés avec des fréquences variables mais là encore avec une prédominance significative des ST10 et ST14.

Chez les Suidae (cochons domestiques), de nombreuses enquêtes ont été réalisées et ce, dans plusieurs pays. Les plus importantes en termes d'animaux testés et d'isolats sous-typés l'ont été en Australie (Wang *et al.* 2014), en Chine (Han *et al.* 2020; Song *et al.* 2017; Wang *et al.* 2018), en Indonésie (Yoshikawa *et al.* 2016), en Corée du Sud (Paik *et al.* 2019) et en Espagne (Rivero-Juarez *et al.* 2020). Pour ces quelques études reflétant une situation générale, la prévalence du parasite est comprise entre 21,7 et 87,1% témoignant de l'importante circulation de *Blastocystis* sp. chez ce groupe d'animaux. Au sein de ce groupe, le ST5 est très largement dominant et est d'ailleurs le seul ST identifié dans certaines études (Alfellani *et al.* 2013c; Fayer *et al.* 2014) suggérant que les Suidae représentent l'hôte naturel de ce ST.

Un autre groupe d'intérêt car très étudié et souvent fortement infecté est celui des oiseaux qu'ils soient domestiques ou sauvages. On peut par exemple citer les études les plus importantes menées en Australie (Lee et Stenzel 1999), au Brésil (Maloney *et al.* 2020), en Colombie (Ramirez *et al.* 2014), en Iran (Asghari *et al.* 2019) et au Liban (Greige *et al.* 2018) avec des prévalences allant de 15 à 90% parmi les oiseaux testés. Pour ce qui est la distribution des STs, globalement les ST6 et ST7 sont largement prédominants dans ce groupe d'animaux d'où l'hypothèse émise que ces deux STs correspondraient à des STs aviaires (Cian *et al.* 2017; Greige *et al.* 2018; Noël *et al.* 2005; Stensvold *et al.* 2009). D'ailleurs plusieurs études n'ont détecté que ces deux STs chez les oiseaux testés (Chandrasekaran *et al.* 2014; D'Alfonso *et al.* 2017; Greige *et al.* 2018).

Pour d'autres groupes d'animaux comme les reptiles, les amphibiens et les insectes, très peu de données sont, à ce jour, disponibles dans la littérature (Cian *et al.* 2017; Kostka *et al.* 2008; Yoshikawa *et al.* 2007, 2016). De nombreux isolats sont représentatifs de nouveaux STs appelés NMASTs pour « Non mammalian and avian STs » qui seraient spécifiques de ces hôtes puisque non identifiés chez d'autres animaux (Cian *et al.* 2017). Il en est de même chez les poissons pour lesquels la seule étude moléculaire jamais menée a montré une prévalence de 3,5% chez des poissons marins (Gantois *et al.* 2020).

7. Evaluation du potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp.

La question du potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp. s'est très vite posée du fait de sa présence et souvent, de sa forte prévalence chez de nombreux groupes d'animaux pouvant être en contact avec la population humaine. Cependant, prouver ce type de transmission reste souvent délicat car cela nécessite d'avoir des données épidémiologiques et moléculaires à la fois pour les animaux et pour les individus vivant à proximité de ces mêmes animaux. D'autre part, confirmer une telle transmission est largement facilité si les animaux en question sont colonisés par des STs qui leur sont spécifiques comme les ST5, ST6, ST7, ST10 et ST14. Pour les autres STs colonisant les animaux et retrouvés majoritairement chez l'Homme comme les ST1 à ST4, cette mise en évidence d'une zoonose est beaucoup plus problématique. Pour toutes ces raisons, très peu d'études ont réellement mis en évidence cette transmission entre l'animal et l'Homme. On peut cependant citer l'étude de Stensvold *et al.* (2009) qui ont montré que des gardiens de zoos anglais en charge de primates colonisés fréquemment par le ST8 étaient eux même infectés à hauteur de 25% par ce même ST ce qui représentait une valeur anormalement élevée pour ce ST qui est extrêmement rare chez l'Homme. De plus, les séquences de ces isolats de ST8 trouvés chez les singes et chez le personnel des zoos étaient identiques. En 2014, l'étude de Wang *et al.* conduite dans un élevage intensif de cochons en Australie a révélé que ces animaux étaient seulement porteurs du ST5. Or, ces auteurs ont aussi montré une prévalence importante de *Blastocystis* sp. chez le personnel de cet élevage et que le ST5 qui est normalement peu répandu dans la population humaine était fortement représenté chez le personnel de cet élevage. De plus, et comme dans l'exemple précédent, on observait 100% d'identité entre les séquences des isolats de ST5 de cochons et du personnel de l'élevage. Enfin, les ST6 et ST7 ont été proposés, depuis plusieurs années, comme étant des STs aviaires (Noël *et al.* 2005 ; Stensvold *et al.* 2009 ; Cian *et al.* 2017) sans que cela ait pu être confirmé comme dans les deux exemples précédents. C'était un point important puisque les isolats de ST6 et ST7 représentent près de 10% des isolats sous-typés en dehors de l'Europe (**Figure 9**). Récemment, Greige *et al.* (2018) ont analysé les ceca d'un grand nombre de poulets de chair dans plusieurs abattoirs du Nord-Liban et montré que plus de 30% de ces animaux étaient colonisés par *Blastocystis* sp. En outre, le sous-typage de ces isolats animaux a révélé la seule présence des ST6 et ST7. De manière intéressante, le ST6 a été retrouvé chez 7% du personnel de ces abattoirs. De plus, les séquences des isolats humains et animaux de ST6 étaient identiques dans cette étude confirmant ainsi la transmission zoonotique du parasite par contact direct et répété avec les

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

animaux. Pour ce qui est des ST10 et ST14 considérés comme des STs spécifiques aux bovins, ils n'ont, à ce jour, jamais été identifiés chez l'Homme suggérant que les bovins ne représenteraient pas un réservoir majeur de transmission zoonotique.

8. Les autres modes de transmission de *Blastocystis* sp.

Outre la transmission zoonotique détaillée précédemment, la transmission anthroponotique ou inter-humaine féco-orale représente probablement, comme pour tous les parasites intestinaux, une voie majeure de circulation de *Blastocystis* sp. notamment pour les ST1, ST2, et ST3 largement prédominants dans la population et éventuellement pour le ST4 principalement en Europe. Cette transmission anthroponotique peut être probablement directe par contact avec des individus infectés en particulier dans des conditions de forte promiscuité mais cela reste très difficile à mettre en évidence. Yoshikawa *et al.* (2000) ont par exemple montré que dans un établissement hospitalier, des patients et du personnel de santé étaient colonisés par les mêmes STs de *Blastocystis* sp. De même, dans une résidence pour jeunes filles de Bangkok en Thaïlande, plus de 30% d'entre elles qui partageaient toutes les installations communes étaient colonisés par le parasite et souvent par le même ST et variant renforçant ainsi l'hypothèse d'une large transmission inter-humaine (Thathaisong *et al.* 2013). Des résultats similaires ont été reportés dans un orphelinat de la province de Nonthaburi en Thaïlande (Boondit *et al.* 2014). Une autre étude toujours menée dans un orphelinat Thaïlandais a montré que les orphelins vivant dans des pièces avec des surveillants infectés par *Blastocystis* sp. avaient plus de risques d'être eux-mêmes colonisés que des orphelins vivant avec des surveillants non infectés (Pipatsatitpong *et al.* 2012). D'autre part, de nombreuses enquêtes dont celles d'Osman *et al.* (2015) et d'Anuar *et al.* (2013) ont clairement montré un risque accru d'infection pour des individus vivant dans une famille présentant des cas d'infection avec ou sans symptômes digestifs.

Pour ce qui est de la transmission féco-orale indirecte via l'eau ou la nourriture contaminées par des kystes issus de selles humaines ou animales, elle est probablement prépondérante car plus aisée que la transmission directe. D'ailleurs l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a en 2006 rajouté *Blastocystis* sp. à la liste des parasites d'origine hydrique. Cependant, comme ce parasite n'est pas systématiquement recherché, très peu d'exemples d'épidémies de blastocystose d'origine hydrique sont relatés dans la littérature comme cela a été souligné par Baldursson et Karanis (2011). On peut cependant citer l'étude de Wu *et al.* (2000) qui ont reporté une épidémie d'origine hydrique impliquant sans doute la

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

consommation d'eau contaminée par *Blastocystis* sp. et qui a touché 1122 personnes en moins de deux mois, toutes présentant des diarrhées. Plus récemment, des cas cliniques de blastocystose et d'épidémies familiales en lien avec la consommation d'eau contaminée par le parasite ont été publiés (Angelici *et al.* 2018; Fréalle *et al.* 2015; Guglielmetti *et al.* 1989).

Blastocystis sp. a été identifié dans diverses sources d'eau que ce soit les eaux usées (influent et effluent), les eaux de surface (rivières ou lacs) ou l'eau potable, ce qui indique que l'eau contaminée peut être une source d'infection humaine et animale (Hublin *et al.* 2020). La fréquence élevée de *Blastocystis* sp. détectée dans diverses sources d'eau à usage domestique (jusqu'à 50% dans l'eau du robinet et jusqu'à 100% dans les réservoirs et conteneurs de stockage d'eau domestique) met en évidence le potentiel de transmission de ce parasite par l'eau. Grâce à la culture *in vitro*, il a été démontré que les kystes de *Blastocystis* sp. récupérés dans 50% des échantillons d'influent totaux et 25% des échantillons d'effluent totaux étaient encore viables (Suresh *et al.* 2005). En outre, il a été démontré que ces mêmes kystes présentent une résistance aux concentrations de chlore utilisées pour désinfecter l'eau potable et conservent un certain degré de viabilité après exposition à l'eau ozonée (Khalifa *et al.* 2001; Zaki *et al.* 1996). *Blastocystis* sp. a ainsi été identifié dans des échantillons d'eaux usées, tant dans les affluents que dans les effluents, aux Philippines, en Malaisie, en Écosse et en Suède et des études moléculaires ont permis d'identifier dans ces eaux principalement les ST1 à ST4 qui, on le sait, sont prédominants dans la population humaine mais aussi le ST6 aviaire et le ST8 (Banaticla et Rivera 2011; Stensvold *et al.* 2020; Suresh *et al.* 2005; Zahedi *et al.* 2019). En Malaisie, les ST1, ST2 et ST3 ont été rapportés dans l'eau des rivières utilisées par les villageois locaux ainsi que dans d'autres sources d'eau du village comme l'eau du robinet, l'eau stockée ou l'eau de puits (Noradilah *et al.* 2016). Au Népal, les ST1 et ST4 ont été identifiés dans une rivière ainsi que chez les habitants et animaux du même village utilisant cette source d'eau, prouvant une fois de plus l'existence d'une transmission par voie hydrique (Lee *et al.* 2012a,b). D'autre part, l'infection chez l'Homme et les animaux a été associée à une contamination des réserves d'eau du robinet par du ST1 en Turquie (Eroglu et Koltas 2010). Ce même ST a également été identifié chez des écoliers et dans l'approvisionnement en eau des écoles correspondantes en Thaïlande (Leelayoova *et al.* 2008).

Comme l'eau même préalablement traitée peut encore contenir des kystes de *Blastocystis* sp. viables, l'utilisation d'eau de surface pour l'irrigation et les opérations de conditionnement présente aussi un risque de contamination des produits frais. En Iran, le sous-typage moléculaire de l'eau utilisée pour l'irrigation des terres agricoles maraîchères a permis d'identifier les ST1, ST6 et ST8 (Javanmard *et al.* 2019), ce qui met en avant le

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

potentiel de transmission par les aliments. Cependant, il est encore difficile de tirer des conclusions sur la transmission du parasite par la nourriture. En effet, les études qui ont été menées manquent de données moléculaires alors que *Blastocystis* sp. a été identifié dans des légumes crus au Brésil (Rodrigues *et al.* 2020), en Arabie Saoudite (Al-Megrin 2010) et en Syrie (Al Nahhas et Aboualchamat 2020) ainsi que dans des paquets de salades prêtes à consommer en Italie (Caradonna *et al.* 2017). Dans une étude menée à Cuba, où *Blastocystis* sp. a été identifié chez 38,5 % des enfants d'une garderie, la consommation de fruits non lavés a été associée de manière significative à une augmentation du risque d'infection par des parasites intestinaux (Cañete *et al.* 2012). L'identification de *Blastocystis* sp. chez les mollusques bivalves suggère également que les fruits de mer contaminés peuvent être une source de transmission alimentaire (Śłodkiewicz-Kowalska *et al.* 2015). Plusieurs enquêtes conduites dans différents pays ont aussi montré que les vendeurs ou manipulateurs de viande étaient significativement plus infectés par ce parasite que la population générale (Bradbury *et al.* 2015; Cruz Licea *et al.* 2003; Salim *et al.* 1999).

Pour compléter ces données sur la transmission de *Blastocystis* sp., il a aussi été décrit que *Blastocystis* sp. serait également susceptible d'être transmis par l'air, une hypothèse récemment validée par une étude menée en Corée du Sud où ce parasite a été détecté dans un collecteur d'air (Han *et al.* 2018). Encore plus surprenant, *Blastocystis* sp. vient d'être détecté dans près de 80% des échantillons de poussières de lit et de salon prélevés dans des maisons en Equateur mettant ainsi en avant un niveau élevé de contamination fécale de l'environnement chez ces habitants (Mejia *et al.* 2020).

9. Impact de *Blastocystis* sp. en santé humaine et animal

Le pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp. reste toujours un sujet controversé et a fait l'objet de nombreuses revues dans la littérature (Ajjampur *et al.* 2016; Boorom *et al.* 2008; Cian *et al.* 2016; Clark *et al.* 2013; Roberts *et al.* 2014; Scanlan 2012; Stensvold *et al.* 2009; Stensvold et Clark 2016; Tan 2008; Tan *et al.* 2010; Wawrzyniak *et al.* 2013). Cette interrogation vient principalement du fait qu'une majorité de porteurs du parasite sont asymptomatiques et ce possiblement pendant plusieurs années (Scanlan *et al.* 2014) suggérant que *Blastocystis* sp. peut aussi être un commensal ayant le potentiel d'agir comme un pathogène opportuniste ce que nous détaillerons ci-dessous. D'autre part, aucun symptôme ne semble être spécifique de la blastocystose puisque des diarrhées et des douleurs abdominales sont principalement décrites chez les patients positifs accompagnées éventuellement par des

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

vomissements, des ballonnements, des flatulences et des nausées. La relation entre la présence de *Blastocystis* sp. et ces symptômes n'est pas toujours évidente puisque les autres agents entéropathogènes (bactéries, virus et autres parasites) pouvant être responsables de ces mêmes symptômes ne sont pas toujours recherchés sauf pour quelques cas cliniques (Fréalle *et al.* 2015 ; Gil *et al.* 2016). De plus, un large éventail de réponses à l'infection par *Blastocystis* sp. peut aussi être lié à la grande diversité génétique observée entre isolats et décrite précédemment.

Pour poursuivre avec les troubles digestifs, il a été suggéré que *Blastocystis* sp. pourrait être associé au syndrome de l'intestin irritable ou IBS (Jadallah *et al.* 2017; Kesuma *et al.* 2019; Nourrisson *et al.* 2014; Poirier *et al.* 2012; Rostami *et al.* 2017; Shariati *et al.* 2019) mais des études complémentaires doivent être réalisées pour clarifier le réel impact de ce parasite dans le développement et la progression de cette pathologie digestive multifactorielle fréquente tout particulièrement dans les pays industrialisés. D'autre part, *Blastocystis* sp. a été fréquemment identifié chez les patients atteints de colite ulcéreuse (Tai *et al.* 2011; Toychiev *et al.* 2021), d'appendicite/péritonite (Fréalle *et al.* 2015; Lintong *et al.* 2012; Thanikachalam *et al.* 2008) et d'ulcères (Janarthanan *et al.* 2011). De plus, ce parasite est aussi fréquent chez les patients atteints de cancer colorectal (Chandramathi *et al.* 2012; Esteghamati *et al.* 2019; Mohamed Mohamed *et al.* 2017; Padukone *et al.* 2017; Toychiev *et al.* 2018; Yersal *et al.* 2016) et il a été suggéré que *Blastocystis* sp. pourrait induire une prolifération accrue des cellules cancéreuses (Ahmed *et al.* 2019) ou même exacerber la cancérogenèse du colon (Kumarasamy *et al.* 2017).

Ces troubles gastro-intestinaux ne sont pas les seuls symptômes décrits associés à la blastocystose chez l'Homme puisque de nombreux cas d'urticaire, d'éruptions cutanées et de démangeaisons en lien avec ce parasite ont été décrits sans qu'une relation de cause à effet soit clairement établie (Bahrami *et al.* 2020; Bálint *et al.* 2014; Kolkhir *et al.* 2016; Lepczyńska *et al.* 2016; Salvador *et al.* 2016; Yilmaz *et al.* 2016). Il a aussi été fréquemment identifié chez les patients dialysés (Barazesh *et al.* 2015; Karadag *et al.* 2013; Omrani *et al.* 2015; Taghipour *et al.* 2020). Globalement, *Blastocystis* sp. est considéré comme un opportuniste communément trouvé chez les transplantés (Silva *et al.* 2020), les immunodéprimés (Bednarska *et al.* 2018; Khorshidvand *et al.* 2020) incluant ceux atteints du virus de l'immunodéficience humaine (Adamu *et al.* 2013; Alemu *et al.* 2011; Fontanelli Sulekova *et al.* 2019; Hamad *et al.* 2018; Kurniawan *et al.* 2009; Paboriboune *et al.* 2014; Piranshahi *et al.* 2018; Tian *et al.* 2012, 2013; Zhang *et al.* 2019).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chez les animaux, la plupart des infections à *Blastocystis* sp. ne semblent pas avoir d'effet sur la santé (Fayer *et al.* 2012, 2014; Ruaux et Stang 2014; Růžková *et al.* 2018). Toutefois, les informations associées à la blastocystose chez l'animal et les présentations cliniques sont limitées, et peu d'études ont été menées pour traiter directement cette question. Un rapport fait par exemple état d'une diarrhée liquide aiguë et de douleurs abdominales chez un macaque d'un centre de recherche, qui ont été associées à une infection à *Blastocystis* sp. (Zanzani *et al.* 2016). Un grand nombre de kystes de *Blastocystis* sp. ont également été observés dans des échantillons de selles d'un autre macaque souffrant de diarrhée chronique et réfractaire à la thérapie conventionnelle (McClure *et al.* 1980). La présence d'un grand nombre de kystes dans les selles a aussi été signalée aux USA chez un chien souffrant de diarrhée chronique, de vomissements et de perte de poids. Il a été postulé qu'une maladie pancréatique sous-jacente avait permis la prolifération de *Blastocystis* sp. chez cet animal (Chapman *et al.* 2009). Au Brésil, un porc-épic a été diagnostiqué avec une diarrhée chronique, une incapacité à se développer et une anorexie. *Blastocystis* sp. fut identifié par PCR et suite à un traitement antiparasitaire, les symptômes ont disparu tout comme le parasite dans les selles (Goe *et al.* 2016). En outre, une infection extra-entérique à *Blastocystis* sp. provoquant un gonflement facial chez un canard a été signalée (Ilchyshyn et Monti 2019).

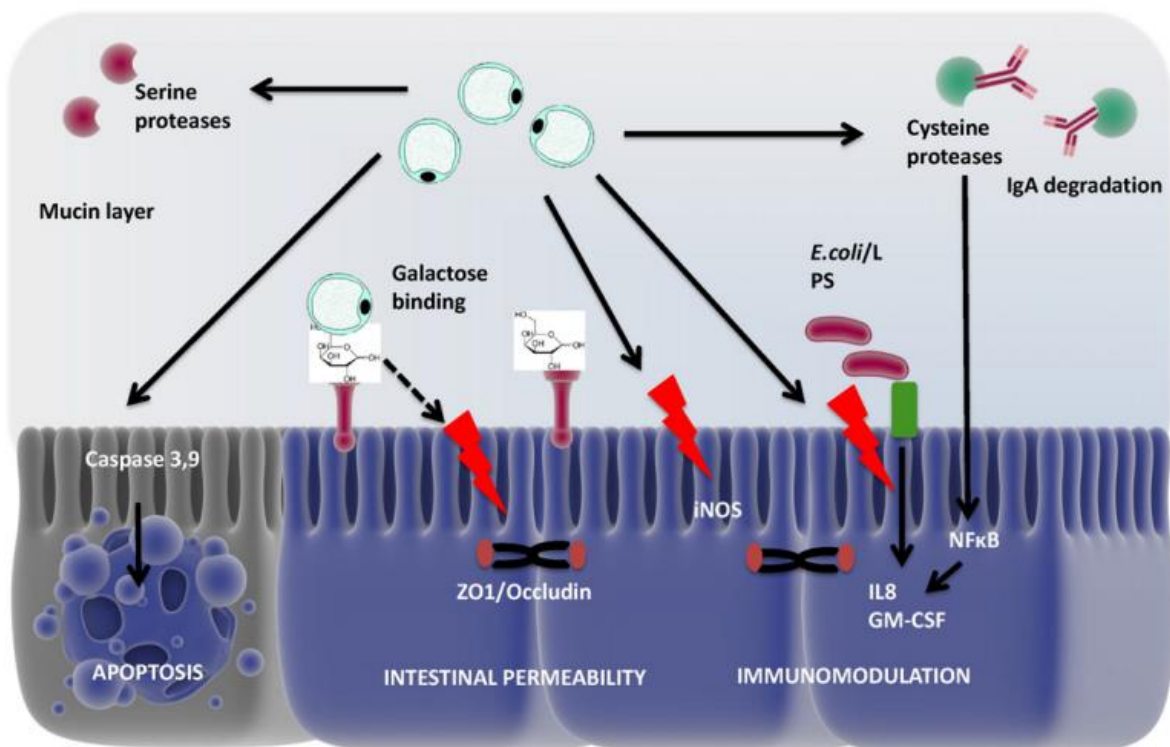
10. Physiopathologie de *Blastocystis* sp.

Afin d'étudier la pathogénicité de *Blastocystis* sp., plusieurs études synthétisées pour la plupart dans la revue d'Ajjampur et Tan (2016) ont porté sur le développement de modèles animaux de blastocystose que ce soit chez la souris, le rat, le cochon d'Inde, la gerbille ou encore le poulet en utilisant différents STs du parasite. Sans rentrer dans les détails puisque ce n'est pas l'objet de ma thèse, d'autres études ont suivi confirmant pour la plupart la pathogénicité du parasite dans des modèles de rongeurs infectés par voie orale ou intra-caecale à travers une infection chronique accompagnée de la dégradation des mucines de la barrière colique, de dommages sur l'épithélium intestinal ou de l'invasion éventuelle des tissus par le parasite voire même de l'initiation d'une cancérogenèse intestinale (Ajjampur *et al.* 2016; Defaye *et al.* 2018, 2020; Kumarasamy *et al.* 2017; Pavanelli *et al.* 2015; Růžková *et al.* 2018; Yason *et al.* 2019). Un problème majeur dans cette approche méthodologique est que les isolats utilisés pour infecter expérimentalement les animaux sont des kystes purifiés issus de selles humaines ou animales et qu'aucun contrôle microbiologique et virologique de l'inoculat n'est généralement réalisé. D'autre part, même si un sous-typage de l'inoculat est

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

mené ce qui n'est d'ailleurs pas toujours le cas, il est possible que le ST détecté soit un ST majoritaire dans le cas d'infections mixtes et que d'autres STs minoritaires présents soient indétectables faussant ainsi les observations et conclusions tirées ultérieurement. En ce sens, l'utilisation d'isolats axéniques et clonés de STs connus et cultivés en laboratoire est donc essentielle. Cependant, les formes cultivées sont les formes vacuolaires et aucune méthode ne permet actuellement de passer *in vitro* en routine de la forme vacuaire à la forme kystique nécessaire à l'inoculation par voie orale. Il est cependant possible d'infecter les animaux avec des formes vacuolaires par voie intra-caecale mais ce mode d'administration chirurgical est très lourd nécessitant une formation et une expertise. De plus, ce mode d'administration entraîne très souvent des infections ou des inflammations voire même la mort des animaux et ne peut être utilisé que sur des périodes d'infection très courtes.

Un modèle animal reproductible n'étant pas disponible, de nombreux chercheurs se sont tournés vers des études *in vitro* afin de clarifier la physiopathologie de *Blastocystis* sp. Je ne détaillerai pas ces expérimentations qui sont synthétisées comme précédemment dans la revue de Ajjampur et Tan (2016) et n'en donnerais que les conclusions principales. Ainsi les travaux impliquant des co-cultures de cellules épithéliales intestinales et principalement des cellules Caco-2 d'adénocarcinome colorectal avec différents STs de *Blastocystis* sp. ou la mise en contact de ces mêmes cellules épithéliales avec des lysats parasitaires ou avec des produits de sécrétion de filtrats de cultures de parasites ont permis l'identification de plusieurs protéines et mécanismes impliqués dans la pathogénicité de *Blastocystis* sp. (**Figure 10**).



ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 10: Modèle schématique représentant les différentes protéines et mécanismes potentiellement impliqués dans la virulence de *Blastocystis* sp. (Ajjampur et Tan 2016).

Dans l'environnement intestinal de l'hôte et lors de la colonisation par le parasite, ce dernier est d'abord capable de dégrader la couche de mucine composée de glycoprotéines associées à des oligosaccharides qui représente la première ligne de défense de l'épithélium intestinal. A travers l'analyse du génome de *Blastocystis* sp. (Denoeud *et al.* 2011), il a été proposé que cette dégradation pourrait se faire sous l'action de fucosidases, hexosaminidases et polygacturonases sécrétées par le parasite (Martínez-Ocaña *et al.* 2020). Ces mucines dégradées représenteraient aussi une source de nutriments pour *Blastocystis* sp. Une fois la couche de mucine dégradée, le parasite est capable d'adhérer à l'épithélium intestinal de l'hôte, préférentiellement au niveau des jonctions inter-cellulaires ou jonctions serrées (Wu *et al.* 2014a,b). Cette adhésion est bloquée par l'addition de galactose dans le milieu d'une co-culture Caco2 / *Blastocystis* sp. suggérant un attachement du parasite aux résidus galactose de la surface de l'épithélium probablement par l'intermédiaire de lectines. Après attachement, *Blastocystis* sp. peut dégrader les jonctions-intercellulaires de l'épithélium. Cette dégradation est induite par des protéases à cystéine sécrétées par le parasite qui sont capables de désorganiser les complexes protéiques de ces jonctions composés en particulier de ZO1 et d'occludine et de provoquer en parallèle la réorganisation des filaments d'actine sous-membranaires (Mirza *et al.* 2012; Puthia *et al.* 2006) entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité intestinale. Deux de ces protéases à cystéine en l'occurrence, la légumaïne et la cathepsine B, ont d'ailleurs été identifiées et bien étudiées par différents auteurs (Wawrzyniak *et al.* 2012; Wu *et al.* 2010). D'autre part, des protéases de *Blastocystis* sp. peuvent induire l'apoptose des entérocytes via l'activation des voies des caspases 3 et 9 de la cellule hôte (Puthia *et al.* 2006; Wu *et al.* 2014a) ce qui contribue aussi fortement au dysfonctionnement de la barrière épithéliale de l'hôte. Il est cependant à noter que cet effet délétère du parasite sur l'épithélium intestinal est ST-dépendant puisque le ST7 induit une augmentation de la perméabilité de l'épithélium alors que le ST4 n'a que des effets négligeables (Mirza *et al.* 2012 ; Wu *et al.* 2014a).

A côté de ses effets directs sur l'épithélium intestinal de l'hôte, *Blastocystis* sp. a aussi des propriétés immunomodulatrices lui permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de coloniser le tube digestif. En particulier, les protéases à cystéine sécrétées par le parasite sont capables de dégrader les IgA prédominantes à la surface de l'épithélium intestinal (Puthia *et al.* 2005) mais aussi d'induire la production de cytokines pro-

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

inflammatoires (Long *et al.* 2001; Puthia *et al.* 2008), via par exemple l'activation de la voie des MAP kinases (Lim *et al.* 2014). Ce parasite est aussi résistant aux peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales de l'intestin en les dégradant à travers la libération de protéases et l'induction d'une acidification de l'environnement atténuant l'activité de ces mêmes peptides (Yason *et al.* 2016). En outre, *Blastocystis* sp. est aussi capable d'échapper au stress nitrosatif induit par les cellules intestinales en réprimant la production d'oxyde nitrique via l'inhibition de l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible en limitant la biodisponibilité de la L-arginine qui est le substrat de cette enzyme (Mirza *et al.* 2011).

Tous ces effets immunomodulateurs permettent la survie et la colonisation du parasite mais aussi celle éventuellement d'autres entéroparasites soit directement soit indirectement du fait des changements potentiels du microbiote intestinal en lien avec l'infection à *Blastocystis* sp. Plusieurs études récentes ont ainsi eu pour but de savoir si ce parasite avait un effet sur la composition du microbiote intestinal de l'hôte (Alzate *et al.* 2020; Andersen *et al.* 2015; Audebert *et al.* 2016; Beghini *et al.* 2017; Calderón de la Barca *et al.* 2020; Castañeda *et al.* 2020; Forsell *et al.* 2016; Gabrielli *et al.* 2020; Iebba *et al.* 2016; Kodio *et al.* 2019; Lappan *et al.* 2019; Nieves-Ramírez *et al.* 2018; Tito *et al.* 2019). Dans tous ces travaux, la colonisation par *Blastocystis* sp. va de paire avec une augmentation de la diversité bactérienne du microbiote de l'hôte. Même si quelques différences apparaissent entre études en lien avec le type de cohorte analysée ou la diversité des STs présents chez les individus infectés, *Blastocystis* sp. est globalement associé à un microbiote eubiotique caractérisé par des espèces bactériennes potentiellement bénéfiques telles que *Prevotella* (Alzate *et al.* 2020 ; Andersen *et al.* 2016 ; Gabrielli *et al.* 2020 ; Nieves-Ramírez *et al.* 2018), *Ruminococcus* (Calderón de la Barca *et al.* 2020; Gabrielli *et al.* 2020) et *Faecalibacterium* (Castañeda *et al.* 2020; Kodio *et al.* 2019) et non avec un microbiote dysbiotique avec une forte abondance de *Bacteroides* (Andersen *et al.* 2016 ; Audebert *et al.* 2016 ; Castañeda *et al.* 2020 ; Forsell *et al.* 2017 ; Gabrielli *et al.* 2020, Lappan *et al.* 2019 ; Tito *et al.* 2019). Si on se base sur la notion d'entérotypes proposée pour une description rapide du microbiome de l'intestin humain par Arumugam *et al.* (2011), *Blastocystis* sp. serait alors plus enclin à coloniser les deux entérotypes dominés respectivement par *Prevotella* et *Ruminococcus* que celui dominé par *Bacteroides*. Cependant, la question de savoir si *Blastocystis* sp. est capable de modifier la composition du microbiote de l'hôte ou si sa colonisation est facilitée par le type d'entérotipe rencontré par le parasite au moment de l'infection reste ouverte.

11. Génomique de *Blastocystis* sp.

Le séquençage des génomes nucléaires de plusieurs isolats de *Blastocystis* sp. a permis d'apporter des informations sur l'architecture respective de ces génomes mais aussi de proposer des gènes candidats potentiellement impliqués dans la physiopathologie ou le métabolisme de ce parasite à mettre en parallèle avec les résultats des études *in vitro*. Brièvement, le premier génome nucléaire séquencé a été celui d'un isolat humain de ST7 (Denoeud *et al.* 2011) dont la taille est de 18,8 Mb avec une prédiction de 6020 gènes codants. Le draft d'un second génome a été publié par Wawrzyniak *et al.* en (2015) et concernait un isolat de ST4 de rongeur. La taille déduite de ce génome n'était que de 12,9 Mb avec 5713 gènes codant pour des protéines. Une comparaison rapide avec le ST7 montrait que près de 30% des gènes de ST4 n'avaient pas d'orthologues dans le génome de ST7. De plus, sur les 20 protéases identifiées pour le ST4 et potentiellement impliquées dans la virulence du parasite, 7 d'entre elles n'avaient pas d'orthologues chez le ST7. Cette extrême diversité génomique entre STs a été récemment confirmée par Gentekaki *et al.* (2017) avec l'apport de la séquence du génome nucléaire d'un isolat de ST1 (16,5 Mb pour 6544 gènes prédits). En effet, en comparant les trois génomes disponibles, ces auteurs ont par exemple montré que le pourcentage de protéines uniques à chaque ST était compris entre 6,2 et 20,5%. De plus, les protéines orthologues entre STs affichent une grande divergence en termes de séquences en acides aminés. En outre, certaines familles de gènes comme par exemple celle codant les protéases à cystéine peuvent être très variables concernant en particulier le nombre de copies de ces gènes entre STs. Ces données suggèrent ainsi de fortes différences entre STs en particulier, en termes de virulence potentielle.

12. Traitement de la blastocystose

Le traitement de la blastocystose soulève au moins deux questions: d'abord qui doit être traité et ensuite quelle molécule doit être utilisée. En pratique clinique, le traitement visant à éradiquer la blastocystose peut être indiqué pour les patients présentant des symptômes gastro-intestinaux sans autre étiologie c'est-à-dire sans autre agent pathogène pouvant induire les mêmes symptômes (Stensvold *et al.* 2010). Stenzel et Boreham (1996) ont associé la symptomatologie de patients à un nombre de parasites supérieur à 5 formes vacuolaires par champ par observation microscopique des selles au grossissement 400 ce qui n'est pas le cas de Leder *et al.* (2005) qui n'ont trouvé aucune corrélation. De même, en utilisant une méthode

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

très sensible comme la PCR en temps réel pour évaluer la charge parasitaire dans les selles, Poirier *et al.* (2011) n'ont pas trouvé de corrélation significative avec les patients symptomatiques. Ces données expliquent pourquoi il n'existe pas de recommandations cliniques valables à ce jour concernant cette parasitose. Les patients asymptomatiques ne sont donc généralement pas traités, contrairement d'ailleurs aux porteurs asymptomatiques de *Giardia lamblia* et *Entamoeba histolytica* (Coyle *et al.* 2012). De nombreux composés ont été utilisés pour traiter la blastocystose (Coyle *et al.* 2012; Kurt *et al.* 2016; Roberts *et al.* 2014, 2015; Stensvold *et al.* 2010) mais la plupart des essais thérapeutiques ont utilisé le métrondazole en traitement de première ligne (Dinleyici *et al.* 2011; Nigro *et al.* 2003; Silva-Díaz *et al.* 2016; Tai *et al.* 2011) avec une éradication significative de *Blastocystis* sp. couplée à une disparition des symptômes. Néanmoins, l'efficacité du métrondazole s'est avérée inconstante selon les études (Batista *et al.* 2017; Harehsh *et al.* 1999; Nagel *et al.* 2012; Rajamanikam *et al.* 2018, 2019; Salvador *et al.* 2016), suggérant des différences potentielles de sensibilité entre les isolats et STs de *Blastocystis* sp. (Mirza *et al.* 2011; Yakoob *et al.* 2004). Aussi, d'autres drogues ont été utilisées en seconde ligne comme le mélange triméthoprime / sulfaméthoxazole avec une efficacité pouvant être, selon les cas, équivalente à celle du métronidazole (Moghaddam *et al.* 2005; Roberts *et al.* 2015; Stensvold *et al.* 2008). Une éradication de *Blastocystis* sp. avec diminution des symptômes a également été observée lors de l'utilisation du nitazoxanide (Rossignol *et al.* 2005; Silva-Díaz *et al.* 2016; Speich *et al.* 2013) associé éventuellement avec la méosalazine (Toychiev *et al.* 2021). C'est aussi le cas avec un antibiotique aminoside tel que la paromomycine (van Hellemond *et al.* 2013; Vogelberg *et al.* 2010). De même, l'atorvastatine s'est avérée efficace couplée au métronidazole (Basyoni *et al.* 2018) tout comme l'auranofine (Yason *et al.* 2018) et un mélange d'antibiotiques (furazolidone, nitazoxanide et secnidazole) (Roshan *et al.* 2020).

Résultats

1. Epidémiologie moléculaire de *Blastocystis* sp. chez des écoliers au Sénégal

Cette étude fait l'objet d'un article publié dans la revue « Microorganisms»

Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese school children

Salma Khaled*, Nausicaa Gantois*, Amadou Tidjani Ly, Simon Senghor, Gaël Even, Ellena Dautel, Romane Dejager, Manasi Sawant, Martha Baydoun, Sadia Benamrouz-Vanneste, Magali Chabé, Seynabou Ndiaye, Anne-Marie Schacht, Gabriela Certad, Gilles Riveau, Eric Viscogliosi

Microorganisms 2020, 8, 1408

* Co-premiers auteurs

a. Contribution de la candidate à l'étude

- Management et organisation de la collection d'échantillons
- Réalisation des expériences de biologie moléculaire et analyse des séquences
- Interprétation des données obtenues
- Rédaction de l'article

b. Résumé de l'étude

Les données actuelles sur la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. restent encore trop rares en Afrique. Aussi, en collaboration avec le Centre de Recherche Biomédicale « Espoir Pour La Santé (EPLS)» localisé à Saint-Louis au Sénégal, nous avons mené la plus large enquête épidémiologique jamais conduite pour *Blastocystis* sp. sur ce continent.

Au total, 731 échantillons de selles ont été collectés auprès d'écoliers ne présentant pas de symptômes digestifs à la date de l'échantillonnage et vivant dans 10 villages de la région du nord-ouest du Sénégal. Tous ces échantillons (1 seul par individu) ont été testés pour la présence de *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel en ciblant un domaine du gène de l'ARNr 18S. Une variation importante de la prévalence du parasite entre les villages (51,7 à 100 %) a

été mise en évidence, avec une prévalence globale dans cette population atteignant 80,4 %. Les 588 échantillons positifs ont ensuite été sous-typés par séquençage. Des infections mixtes (infections par au moins deux STs non déterminés dans cette étude) ont été identifiées chez 23 % des individus positifs. Parmi les 453 écoliers présentant une infection simple, le ST2 était prédominant (49,9%), suivi du ST1 (24,9%), du ST3 (23,6%), du ST7 (0,7%), du ST10 (0,45%) et du ST14 (0,45%). Globalement, les ST1 à ST3 représentaient 98,4% des échantillons sous-typés dans cette étude mettant en avant une large transmission inter-humaine. Concernant le ST7, il est considéré comme un ST aviaire et de ce fait son origine chez les 3 enfants infectés dans notre enquête était très probablement d'origine zoonotique. Pour ce qui est des ST10 et ST14, ils ont chacun été trouvés chez 2 écoliers sénégalais. Or, ces deux STs sont prédominants chez les bovins et n'avaient encore jamais été identifiés chez l'Homme. C'est donc la première fois que ces deux STs sont trouvés dans la population humaine et leur origine zoonotique ne fait guère de doute. Quoiqu'il en soit, les isolats considérés d'origine animale dans notre cohorte étaient en nombre restreint soulignant le faible risque de transmission zoonotique dans ce pays comme plus globalement en Afrique.

Par la suite, les séquences obtenues pour les isolats de *Blastocystis* sp. appartenant à un même ST (ST1, ST2 ou ST3) ont été alignées entre elles afin de déterminer la diversité intra-ST et identifier les différents génotypes présents. Globalement, nos données ont mis en évidence une plus faible diversité génétique du ST3 par rapport aux ST1 et ST2. Cette faible diversité génétique suggérait que la plupart des infections à ST3 étaient principalement causées par une transmission anthroponique. En revanche, les nombreux génotypes identifiés pour les ST1 et ST2 dans la population sénégalaise et souvent représentés par un seul isolat, laissaient penser à une possible exposition des enfants à différentes sources d'infection extérieures en plus de la transmission interhumaine.

Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese school children

Salma Khaled ^{1,†}, Nausicaa Gantois ^{1,†}, Amadou Tidjani Ly ², Simon Senghor ², Gaël Even ^{3,4}, Ellena Dautel ¹, Romane Dejager ¹, Manasi Sawant ¹, Martha Baydoun ¹, Sadia Benamrouz-Vanneste ^{1,5}, Magali Chabé ¹, Seynabou Ndiaye ⁶, Anne-Marie Schacht ^{1,2}, Gabriela Certad ^{1,7}, Gilles Riveau ^{1,2} and Eric Viscogliosi ^{1,*}

¹ Institut Pasteur de Lille, U1019–UMR 9017–CIIL–Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France; salmakhaled94@outlook.com (S.K.); nausicaa.gantois@pasteur-lille.fr (N.G.); dautel.ellena@gmail.com (E.D.); romanedejager97@gmail.com (R.D.); manasi.sawant@pasteur-lille.fr (M.S.); martha.e.b@hotmail.com (M.B.); sadia.vanneste@gmail.com (S.B.-V.); magali.chabe@univ-lille.fr (M.C.); am.schacht@gmail.com (A.-M.S.); gabriela.certad@pasteur-lille.fr (G.C.); gilles.riveau@gmail.com (G.R.)

² Biomedical Research Center Espoir Pour La Santé (BRC-EPLS), BP 226, Saint-Louis, Senegal; tidjani.ly@espoir-sante.org (A.T.L.); simon.senghor@espoir-sante.org (S.S.)

³ Gènes Diffusion, F-59501 Douai, France; g.even@genesdiffusion.com

⁴ PEGASE-Biosciences (Plateforme d’Expertises Génomiques Appliquées aux Sciences Expérimentales), Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

⁵ Laboratoire Ecologie et Biodiversité, Institut Catholique de Lille, Faculté de Gestion Economie et Sciences, F-59000 Lille, France

⁶ Région Médicale de Saint-Louis, MSAS, Saint-Louis, Senegal; zeynab43@yahoo.fr

⁷ Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation, Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille, F-59000 Lille, France

* Correspondence: eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

† Equal contributors

Abstract: *Blastocystis* sp. is an enteric protozoan that frequently colonizes humans and many animals. Despite impacting on human health, data on the prevalence and subtype (ST) distribution of *Blastocystis* sp. remain sparse in Africa. Accordingly, we performed the first multicenter and largest epidemiological survey ever conducted on *Blastocystis* sp. for this continent. A total of 731 stool samples collected from healthy school children living in 10 villages of the northwestern region of Senegal were tested for the presence of *Blastocystis* sp. by real-time polymerase chain reaction followed by subtyping of positive samples. Considerable variation in prevalence between villages (51.7 to 100%) was evident with the overall prevalence being 80.4%. Mixed infections were identified in 23% of positive individuals. Among 453 school children with a single infection, ST2 was predominant, followed by ST1, ST3, ST7, ST10, and ST14; this is the first report of ST10 and ST14 in humans. Genetic polymorphisms were evident at the intra-ST level with the identification of numerous ST1 to ST3 genotypes. ST1 showed the greatest intra-ST diversity followed by ST2 and ST3. The prevalence and distribution of STs and genotypes varied among target villages, pointing to several potential infection sources, including human-to-human, zoonotic, and waterborne transmission.

Keywords: *Blastocystis* sp.; intestinal parasites; Africa; Senegal; molecular epidemiology; real-time quantitative PCR; SSU rDNA sequence; subtyping; transmission; zoonosis

1. Introduction

Blastocystis sp. is an enteric protozoa with a worldwide distribution, frequently found in human as well as in various animal groups spanning from non-human primates to insects [1–6]. As the main mode of transmission of this parasite is the fecal–oral route through the host colonization by the transmissible environment-resistant cystic form [7], its prevalence in the human population is strongly correlated to sanitary conditions, hygiene practices, and quality of drinking water. Not surprisingly, the prevalence of *Blastocystis* sp. is thus much lower in industrialized countries than in lower-income geographical areas [5]. For instance, it reaches 10 to 20% in European countries [8–11] but can largely exceed 40–50% in various African [12,13], Asian [14,15], and American countries [16,17].

The high prevalence of *Blastocystis* sp. described in healthy individuals also raises the long-standing question of its real pathogenicity and clinical impact in the human population [5,18–20]. Indeed, this single-celled microorganism was commonly found in individuals with neither any gastrointestinal complaints nor symptoms. In contrast, it was the only causative agent identified in the stools of patients presenting gastrointestinal symptoms such as diarrhea or abdominal pain [21] but also urticaria [22]. Therefore, under certain circumstances or interactions with the host, colonization by *Blastocystis* sp. becomes infection [5,6,21,22]. In that respect, recent in vitro studies have led to the identification of molecules and mechanisms potentially involved in the pathogenicity of *Blastocystis* sp. [23].

An extensive genetic diversity has been highlighted among numerous *Blastocystis* sp. isolates from both humans and animal hosts on the basis of small subunit (SSU) rDNA gene sequences analysis [24,25]. Formerly, 17 separate lineages, so-called subtypes (STs) arguably species, had been clearly recognized among mammalian and avian isolates (ST1 to ST17) [26]. Recently, epidemiological surveys conducted in various mammalian and non-mammalian (reptiles, fish, and insects) sources described isolates representative of potential novel STs [3,4,27–30]. However, several if not all of these proposed STs are likely invalid and should be rejected at this time until near-complete SSU rDNA gene sequences should be generated.

Among the 17 mammalian and avian STs recognized so far, 10 of them (ST1–ST9 and ST12) have been identified in the human population even if ST1–ST4 appear by far to be the most common colonizers of the human intestinal tract [19,31,32]. Indeed, ST1–ST4 represent nearly 95% of the subtyped isolates in the world, which is consistent with large-scale parasite spread directly from person to person (anthroponotic transmission).

Conversely, the rarer STs in humans (ST5–ST9 and ST12) are frequently harbored by various animal groups including non-human primates (ST8) [4,33], hoofed animals (ST5) [34], and birds (ST6 and ST7) [35], strongly suggesting the zoonotic origin of these STs in humans.

Despite the current burden of *Blastocystis* sp. in humans, only sparse molecular studies provide information on the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in the African population. However, most African countries are considered to be at high risk of *Blastocystis* sp. infection due to poor access to sanitation and clean water, thus favoring parasite transmission. To date, the available data mainly concerns few countries of the Northern, Western, and Central Africa such as Libya [31], Egypt [36], Nigeria [37], Côte d'Ivoire [38], Senegal [12], and Cameroon [13]. Moreover, these epidemiological studies remained based on cohorts still too limited in size. Consequently, it is necessary to keep expanding the molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in Africa through additional studies to further clarify aspects of prevalence, ST distribution, and potential sources of transmission of this parasite. Therefore, the aim of the present study was to reinforce the picture of *Blastocystis* sp. impact and circulation by performing the first multicenter and largest epidemiological survey ever conducted in Africa.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Approval

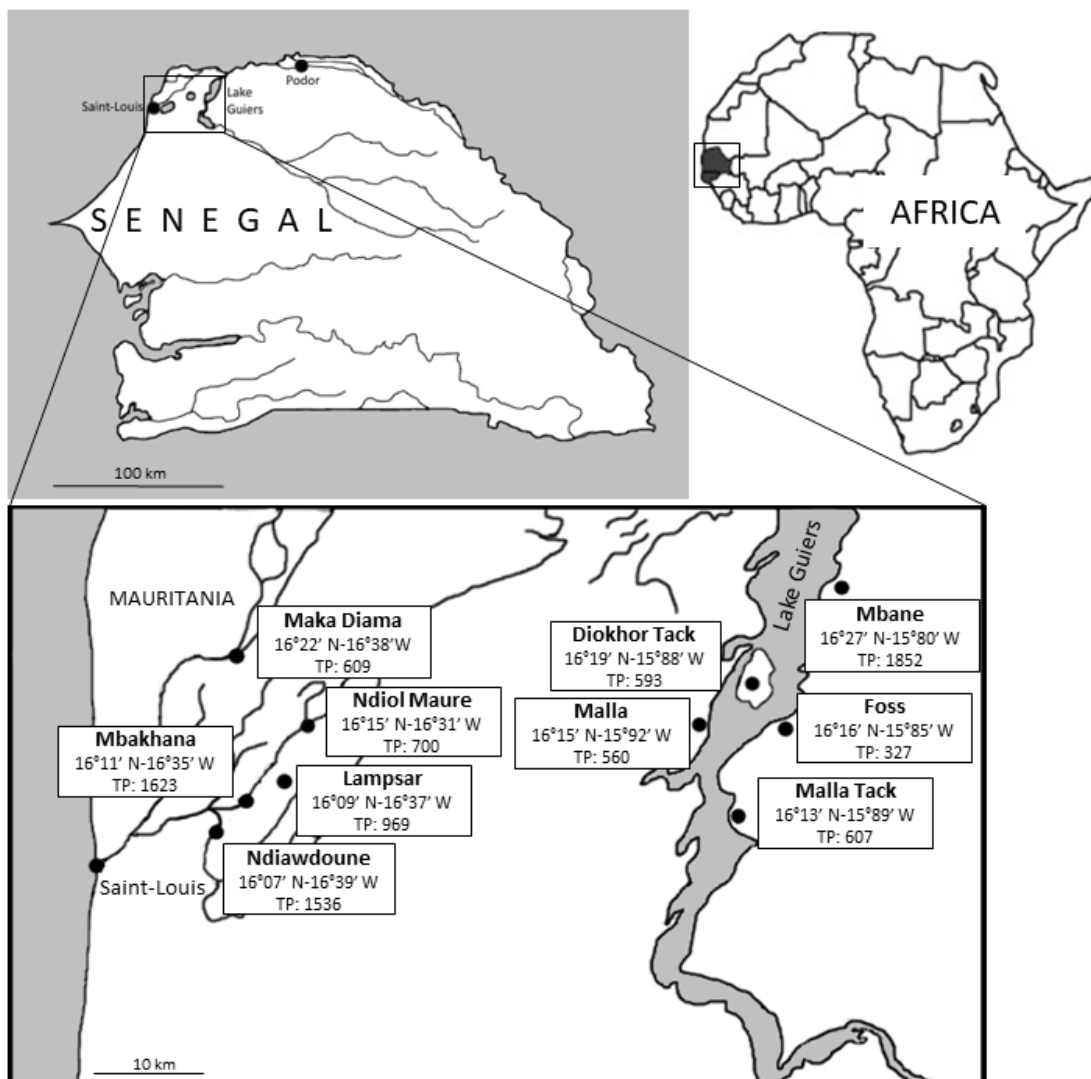
The present study was sponsored by the Biomedical Research Centre Espoir pour la Santé (Saint-Louis, Senegal: www.espoir-sante.org) and approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health and Social Action of Senegal (reference number 000146/MSAS/DPRS/CNERS; protocol number SEN19/43; Date of approval: 08/27/2019). Written and oral informed consents were obtained from the parents or the legal guardians of the children for biological samples. The subjects' data were collected anonymously (with encryption of the identity of individuals). This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki III) and with the International Ethical Guidelines for Biological Research Involving Human Subjects.

2.2. Sampling Sites

The study was conducted in 10 villages of the Saint-Louis (Maka Diama, Ndiol Maure, Lampsar, Mbakhana, Ndiawdoune, Mbane, Diokhor Tack, and Malla) and Louga (Foss and Malla Tack) regions located in northwestern Senegal. The geographical coordinates of the villages together with their total population are indicated in Figure 1. Five of these

villages are located in the Senegal River Basin (so-called herein area of Saint-Louis), either on the banks of the Senegal River (Maka Diama), Lampsar River (Ndiol Maure, Lampsar and Mbakhana), or Ngalam River (Ndiawdoune). The five other villages are located around the Lake Guiers (so-called area of Lake Guiers). Lake Guiers is mainly supplied to the north by the Senegal River, to which it is connected by the canalized Taouey River and represents a chief source of fresh water for the city of Dakar. The two areas of Saint-Louis and Lake Guiers are separated by ~50 km.

Figure 1. Detailed location of the 10 villages in Northwestern Senegal screened for the presence of *Blastocystis* sp. by qPCR. Geographic coordinates and total population (TP) of each of the villages are indicated.



Throughout the villages, the habitat is of urban type with houses built as permanent constructions except for the village of Maka Diama where some traditional dwellings subsist. Regarding sanitary and environmental conditions, all villagers use traditional latrines, isolated pit latrines with (very few) or without flushing or open-air toilet facilities (mainly children). In contrast, water supplies and their use (drinking; washing; bathing; domestic activities such as cooking, household cleaning, dishes, and laundry; and irrigating crops) differ between villages according to their geographical location and socio-economic status (Table 1). With the exception of Maka Diama, Ndiol Maure, Mbakhana, and Mbane, all other villages have a fishing activity which remains rather limited. In addition, the breeding of farm animals (cattle, sheep, goats, donkeys, chickens, and horses) is practiced in all the villages.

Table 1. Water supplies and usage in the 10 Senegalese villages studied.

Villages	Water Sources and Usage
Area of Saint-Louis	
Maka Diama	Tap water ^a (Drinking, washing, domestic activities ^b) Senegal River (Domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Ndiol Maure	Tap water ^a (Drinking, washing, domestic activities ^b) Lampsar River (Domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Lampsar	Tap water ^a (Drinking, washing, domestic activities ^b) Lampsar River (Domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Mbakhana	Tap water ^a (Drinking, washing, domestic activities ^b) Lampsar River (Domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Ndiawdoune	Tap water ^a (Drinking, washing, domestic activities ^b) Ngalam River (Domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Area of Lake Guiers	
Mbane	Tap water ^a (Drinking, washing, domestic activities ^b) Lake Guiers (Domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Diokhor Tack	Lake Guiers (Drinking, washing, domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Foss	Lake Guiers (Drinking, washing, domestic activities ^b , bathing, irrigating crops) Public and private water wells (Drinking, washing)
Malla	Tap water non-potable at a single point in the village (Drinking, washing, domestic activities ^b) Lake Guiers (Drinking, washing, domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)
Malla Tack	Tap water non-potable in 3 houses of the village (Washing, domestic activities ^b) Lake Guiers (Drinking, washing, domestic activities ^b , bathing, irrigating crops)

^a Tap water in less than 20% of the dwellings (most prosperous part of the population). ^b Domestic activities consisting mainly of cooking, household cleaning, dishes and laundry.

2.3. Cohort and Collection of Samples

Sampling was conducted between August 2019 and October 2019. During the warm season (March to October), temperature ranges between 25 °C and 45 °C. Under the supervision of school directors, 25 to 104 stool samples were collected in the schools of each of the 10 villages from elementary school children (1 sample per individual). Date of birth of each child was ascertained from vaccination cards or school register. A total of 731 stool samples were thus collected from boys ($n = 379$) and girls ($n = 352$) (sex ratio M/F of 1.08) and the age of participants was between 6 and 19 years (mean age of 10.5 ± 2.09 years). Sampling size was quite similar between the two study areas of Saint-Louis (363 stool samples) and Lake Guiers (368). For each school child, ~2 g of fresh stool was added to 2 mL of 2.5% potassium dichromate (*w/v* in water) (Sigma Life Sciences, Saint-Louis, MO, USA) in a sterile tube then homogenized by shaking. All samples were transported at 4 °C to the Institut Pasteur of Lille (France).

2.4. DNA Extraction and Molecular Subtyping of *Blastocystis sp.* Isolates

One mL of diluted stool from each sample was stirred and then centrifuged 3 times for 10 min at $3000\times g$ with water to remove all traces of potassium dichromate. The resulting stool pellet was diluted in 500 μ L of water. Total genomic DNA was extracted from the diluted pellet using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended procedures. DNA extraction negative controls were included. DNA was eluted in 100 μ L of elution (AE) buffer provided in the DNA extraction kit and stored at -20°C until being analyzed. For each sample tested, 2 μ L of extracted DNA was subjected to a qPCR assay using the *Blastocystis*-specific primers BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAA-3') and BL18SR2PP (5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3') targeting the small subunit (SSU) rDNA gene [39]. DNA extraction controls were also used in qPCR assays and both positive (DNAs from *Blastocystis sp.* ST7 and ST4) and negative (DNA matrix replaced by water) qPCR controls were included. The positive qPCR products were purified and directly sequenced on both strands by Genoscreen (Lille, France). For a significant proportion of samples, sequence chromatograms analysis revealed the presence of double traces, suggesting infections by at

least two different *Blastocystis* STs. In these cases, the STs present were not determined and these positive samples were considered as mixed infections. The SSU rDNA sequences obtained in this study were deposited in GenBank under accession numbers MT621678 to MT622130. These sequences were compared with all *Blastocystis* sp. homologous sequences of known STs available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. The STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known mammalian and avian *Blastocystis* sp. STs according to the most recent classifications of the parasite [4,26]. Subsequently, the sequences of *Blastocystis* sp. isolates belonging to the same ST (ST1, ST2 or ST3) were aligned with each other using the BioEdit v. 7.0.1 package (Date of release 06/10/2019) (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) to determine intra-ST diversity and identify so-called genotypes referring to genetically distinct strains within a same ST. The term “genotype” was proposed in a previous survey [35] to prevent any confusion with the term “allele” already used by others and designed through the comparison of sequences from another domain of the SSU rDNA gene [18,40].

2.5. Statistical Analysis

For the statistical analysis, Fisher’s exact test was used to test the relationship between different categorical variables. Logistic regression models were created to calculate odds ratios (OR) and 95% confidence interval (CI) considering *Blastocystis* sp. colonization, STs, and genotypes as the main outcomes. The general significance level was set at a *p*-value below 0.05. All analyses were performed using packages stats and OR from the R statistical computing program v. 3.6.1 (Date of release 07/05/2019) (R Development Core Team; <http://www.R—project.org>).

3. Results

3.1. Prevalence of *Blastocystis* sp. in the Cohort of Senegalese School Children

Single stool samples were collected from a total of 731 school children living in 10 villages of the region of Saint-Louis in Senegal. All were considered asymptomatic due to the apparent absence of digestive disorders. The overall prevalence of *Blastocystis* sp.-positive individuals was shown to be 80.4% (588/731) using qPCR (Table 2). The difference in prevalence observed between males (51.5%) and females (48.5%) colonized by the parasite was not significant (OR: 0.937, CI: 0.649-1.351, *p* = 0.729). In addition, the mean age of *Blastocystis* sp.-colonized children was not significantly different compared to the age of

Blastocystis sp.-free subjects (mean age of 10.54 ± 2.12 years versus 10.36 ± 1.99 ; OR: 1,28, CI: 0.755-2.219, $p = 0.3684$). The prevalence of the parasite was then analyzed separately in the two areas of Saint-Louis and Lake Guiers. The average prevalence observed in the area of Saint-Louis was slightly significantly higher than that of the area of Lake Guiers (83.5% versus 77.4%; OR: 1.471, CI: 1.018-2.134, $p = 0.04$). At the village level, the prevalence of *Blastocystis* sp. was highly variable, ranging from 51.7% to 100% (Table 2). Within the area of Saint-Louis, the parasite was significantly more prevalent in the village of Ndiawdoune than in the 4 other villages of the same area (OR: 11.58043, CI: 1.899-474.992, $p = 0.0009$), while it was significantly less prevalent in the village of Ndiol Maure (OR: 0.277, CI: 0.145-0.531, $p < 0.0001$). In the same way, within the area of Lake Guiers, the prevalence of *Blastocystis* sp. was significantly higher in the villages of Malla (OR: 5.794, CI: 11.794-29.83, $p = 0.000643$) and Malla Tack (OR: 2.775, CI: 1.374-6.103, $p = 0.003$) and lower in the one of Mbane (OR: 0.180, CI: 0.102-0.317, $p < 0.0001$).

Table 2. Prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in the 10 Senegalese villages screened in the present study.

Villages	Samples (n)	Positive Samples (n)	Prevalence (%)	<i>Blastocystis</i> sp. STs						MI ^a
				ST1	ST2	ST3	ST7	ST10	ST14	
Area of Saint-Louis										
Maka Diama	75	57	76.0	15	15	13	0	1	0	13
Ndiol Maure	71	47	66.2	18	12	9	0	0	0	8
Lampsar	86	77	89.5	8	27	27	2	0	0	13
Mbakhana	81	72	88.9	11	27	13	0	0	1	20
Ndiawdoune	50	50	100	0	24	10	1	0	1	14
Total area	363	303	83.5	52	105	72	3	1	2	68
Area of the Lake Guiers										
Mbane	89	46	51.7	17	11	10	0	0	0	8
Diokhor Tack	104	80	76.9	22	32	7	0	0	0	19
Foss	25	23	92.0	7	8	3	0	0	0	5
Malla	54	51	94.4	2	34	3	0	0	0	12
Malla Tack	96	85	88.5	13	36	12	0	1	0	23
Total area	368	285	77.4	61	121	35	0	1	0	67
Grand total	731	588	80.4	113	226	107	3	2	2	135

^a MI, Mixed infections.

The qPCR products of the 588 samples positive for *Blastocystis* sp. were all sequenced on both strands. For 135 of these samples (23%), sequence chromatogram analysis revealed the presence of double traces, reflecting mixed infection by different STs that were not identified. The remaining 453 isolates corresponded to single infection by one ST. All partial SSU rDNA gene sequences obtained from these 453 positive samples showed 98 to 100% identity with homologous sequences available in databases for known STs (Table 2). ST2 was predominant ($n = 226$, 49.9%), followed by ST1 ($n = 113$, 24.9%), ST3 ($n = 107$, 23.6%), ST7 ($n = 3$, 0.7%), ST10, and ST14 (both $n = 2$, 0.45%). This distribution of *Blastocystis* sp. STs in our overall population was not significantly associated with gender (Fisher's exact test, $p = 0.3$) or age (Fisher's exact test, $p = 0.75$) of the individuals. On the other hand, significant difference in the distribution of predominant STs (ST1 to ST3) was found between the area of Saint-Louis and that of the Lake Guiers (Fisher's exact test, $p = 0.0007$). A strong overabundance of ST3 was identified in the area of Saint-Louis (OR: 2.398, CI: 1.529-3.819, $p = 0.0002$), whereas ST2 was slightly more frequently found in the area of Lake Guiers (OR: 0.679, CI: 0.467-0.985, $p = 0.04$). The distribution of STs also varied between the villages, even within the same area and even though ST2 was predominant in 8 of the 10 villages screened. ST1 was significantly less abundant in Lampsar (OR: 0.39, CI: 0.155-0.862, $p = 0.01$), Malla (OR: 0.217, CI: 0.042-0.706, $p = 0.004$) and Ndiawdoune (OR: 0, CI: 0-0.308, $p < 0.0001$), and more reported in Ndiol Maure (OR: 2.778, CI: 1.335-5.731, $p = 0.03$) and Mbane (OR: 2.597, CI: 1.233-5.404, $p = 0.01$), while ST3 was more predominant in Lampsar (OR: 2.935, CI: 1.606-5.320, $p = 0.003$) and less frequently reported in Malla (OR: 0.236, CI: 0.046-0.772, $p = 0.01$) and Diokhor Tack (OR: 0.371, CI: 0.138-0.855, $p = 0.01$). Moreover, ST2 was significantly more frequently found in Malla (OR: 6.322, CI: 2.55-18.83, $p < 0.0001$), Ndiawdoune (OR: 2.50, CI: 1.112-6.015, $p = 0.02$) and less reported in Mbane (OR: 0.368, CI: 0.160-0.791, $p = 0.006$), Maka Diama (OR: 0.490, CI: 0.236-0.984, $p = 0.04$), and Ndiol Maure (OR: 0.403, CI: 0.181-0.851, $p = 0.01$). Rare human STs including ST7, ST10, and ST14 were more frequently identified in the area of Saint-Louis (identification of three ST7, one ST10, and two ST14 isolates) than in the area of Lake Guiers (identification of a single ST10 isolate).

All the partial SSU rDNA gene sequences representative of the same ST were aligned with each other to assess intra-ST diversity. The 113 ST1 sequences showed 97.2% to 100% identity between them. By comparing all these ST1 sequences, 12 positions were reported as

variable, i.e., positions exhibiting at least one nucleotide difference within at least one of the compared sequences (Figure 2), allowing the identification of 15 so-called genotypes (ST1-1–ST1-15).

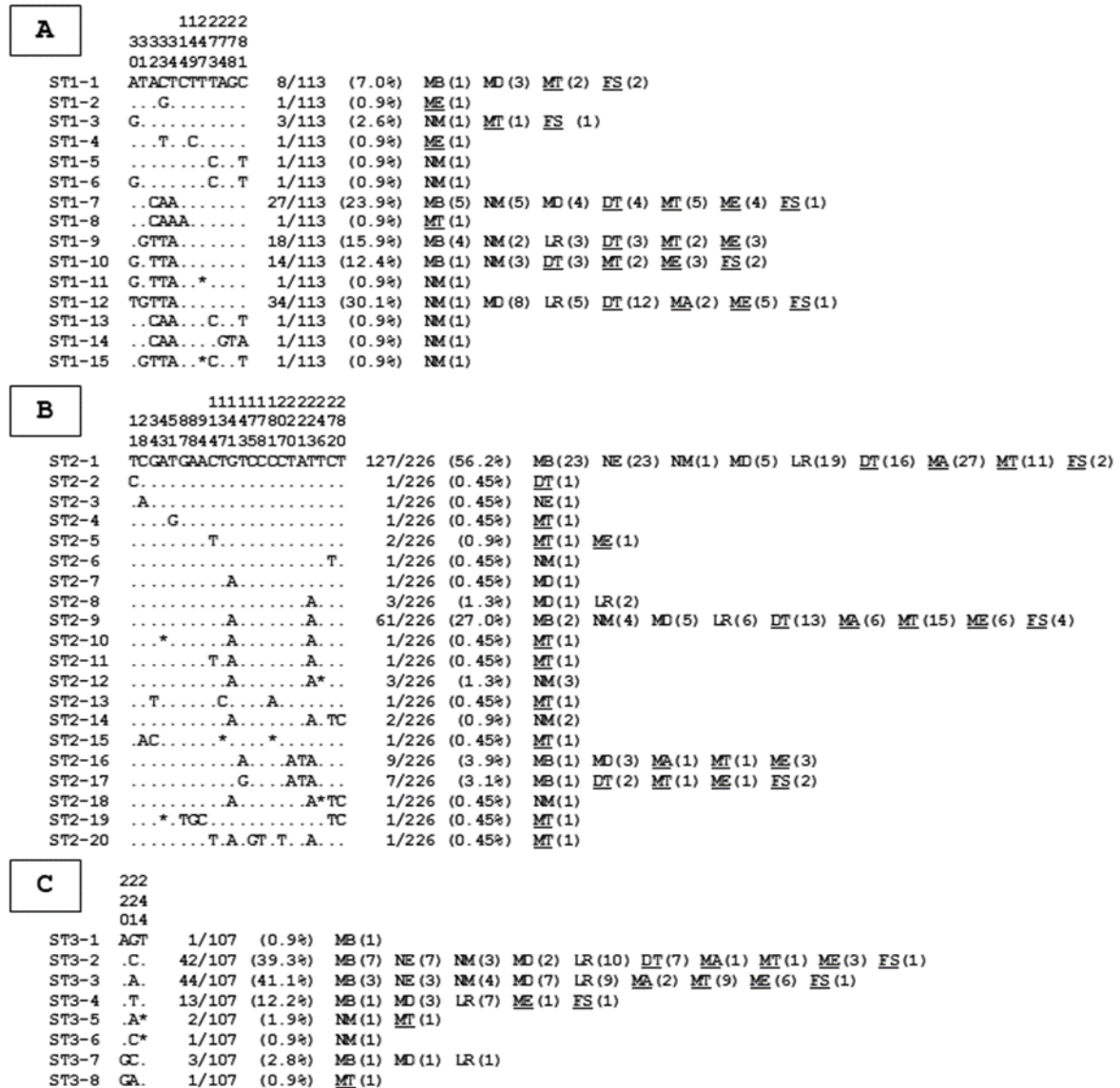


Figure 2. Alignment of partial SSU rDNA gene sequences from *Blastocystis* sp. ST1 (A), ST2 (B), and ST3 (C) isolates. Only the variable positions identified in the compared domain of the gene for these STs are shown in this alignment. The positions of variable nucleotides with respect to the reference sequences (genotypes ST1-1, ST2-1, and ST3-1) are indicated above the alignment (vertical numbering). Nucleotides identical to those of the reference sequences are represented by dashes and gaps are represented by asterisks. All the genotypes identified for each ST are indicated on the left of the alignment. On the right of the alignment is reported the total number and percentage of

isolates identified in our study for each genotype followed by their repartition per village (number of isolates in parentheses). Abbreviations: MB, Mbakhana; MD, Maka Diama; NM, Ndiol Maure; LR, Lampsar; NE, Ndiawdoune; MT, Malla Tack; FS, Foss; ME, Mbane; DT, Diokhor Tack; MA, Malla. The abbreviations of the villages located in the area of Lake Guiers are underlined, which is not the case of those located in the area of Saint-Louis.

The ratio between the number of ST1 isolates and the number of ST1 genotypes was 7.5 (113/15). Among these genotypes, four of them (ST1-7, ST1-9, ST1-10, and ST1-12) identified in six to seven villages comprised more than 80% of the ST1 isolates (93/113), while nine other ST1 genotypes were only represented by a single isolate. Regarding ST2 sequences, their identity with each other ranged from 95.8 to 100%. The alignment of the 226 ST2 sequences allowed the identification of 22 variable positions, leading to 20 ST2 genotypes (ST2-1 to ST2-20), with an average of 11.3 isolates per genotype (226/20). Only two of these genotypes, ST2-1 and ST2-9, both present in nine of the 10 villages screened, accounted for more than 80% of the ST2 isolates (188/226). In contrast, more than half of the ST2 genotypes (12/20) were represented by a single isolate. The identity between the sequences of the 107 ST3 isolates was comprised between 98.9 and 100%, with the identification of only three variable positions, leading to 8 ST3 genotypes (ST3-1 to ST3-8). The ratio between the number of isolates per ST3 genotype reached 13.4 (107/8). The two predominant genotypes, ST3-2 and ST3-3, included more than 80% of the ST3 isolates and were found in 10 and nine villages, respectively. On the other hand, three ST3 genotypes were represented by only one isolate (ST3-1, ST3-6, and ST3-8).

In the two compared areas, the number of ST1 to ST3 genotypes identified was roughly similar (30 genotypes in the area of Saint-Louis versus 27 in the area of Lake Guiers). However, genotypes ST3-2 (OR: 2.311, CI: 1.184-4.741, $p = 0.02$) and ST3-4 (OR: 5.47, CI: 1.443-35.67, $p = 0.03$) were more frequently reported in the area of Saint-Louis, while ST2-9 was predominantly found in the area of Lake Guiers (OR: 0.306, CI: 0.164-0.549, $p = 0.0001$). A large variability in the number of genotypes was also reported between villages even within the same region (Table 3). Within the area of Saint-Louis, the calculated ratio between the total number of subtyped isolates (ST1, ST2, and ST3) and the total number of genotypes identified from each village ranged between 1.9 and 8.5, for an area average of 7.6 isolates per genotype. In the area of Lake Guiers, this ratio showed a slightly narrower range, between 1.6 and 6.8. The average ratio within this area (8.0) was quite similar to that

calculated for the area of Saint-Louis. Moreover, ST3-4 and ST2-9 were the only genotypes that were significantly more abundant in our survey, respectively, in Lampsar (OR: 7.0, CI: 1.93-26.34, $p = 0.0007$) and Malla Tack (OR: 3.13, CI: 1.45-6.56, $p = 0.001$).

Table 3. Distribution of ST1, ST2, and ST3 genotypes of *Blastocystis* sp. in the 10 Senegalese villages.

Villages	ST1 Isolates	ST1 Genotypes/15	ST2 Isolates	ST2 Genotypes/20	ST3 Isolates	ST3 Genotypes/8	Total ST1, ST2 and ST3 Isolates	Total ST1, ST2 and ST3 Genotypes/43	Total Isolates/Total Genotypes
Area of Saint-Louis									
Maka Diama	15	3	15	5	13	4	43	12	3.6
Ndiol Maure	18	11	12	6	9	4	39	21	1.9
Lampsar	8	2	27	3	27	4	62	9	6.9
Mbakhana	11	4	27	4	13	5	51	13	3.9
Ndiawdoune	0	0	24	2	10	2	34	4	8.5
Average							229	30	7.6
Area of Lake Guiers									
Mbane	17	6	11	4	10	3	38	13	2.9
Diokhor Tack	22	4	32	4	7	1	61	9	6.8
Foss	7	5	8	3	3	3	18	11	1.6
Malla	2	1	34	3	3	2	39	6	6.5
Malla Tack	13	6	36	12	12	4	61	22	2.8
Average							217	27	8.0

Regarding rarer STs such as ST7, sequences of three isolates were compared, showing 99.6 to 100% identity (only one variable position). In case of ST10 and ST14, two sequences were obtained and compared for each of these two STs, exhibiting 98.9 (3 variable positions) and 96.9% (9 nucleotide differences) identity, respectively.

4. Discussion

The present study represents the largest-scale epidemiological survey ever conducted in Africa regarding the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. and gives a more comprehensive overview of the parasite circulation in African developing countries. The

overall prevalence observed herein among Senegalese school children reached 80.4%, highlighting the burden of *Blastocystis* sp. in this part of the world. This is in line with a previous study also conducted in Senegal in which the prevalence of *Blastocystis* sp. reached 100% among a limited cohort of ~100 children living in the Podor district located further north of the country [12]. This represented the highest prevalence of the parasite ever observed worldwide. Strikingly, a prevalence of 100% was also reported in the present study in the village of Ndiawdouné by screening a limited cohort of 50 school children (Table 2).

The data obtained herein were thus compared with those reported in other African regions and countries (Table 4). In this aim, only data obtained by molecular methods were recorded as non-molecular methods such as microscopic observation of fresh feces are known to greatly underestimate the prevalence of the parasite [39,41]. The prevalence of the parasite ranges between 25.6% and 100% depending on the geographical area [12,13,31,36-38,41-53]. By focusing on the neighboring countries of Senegal (West Africa), the prevalence of *Blastocystis* sp. was, respectively, 58.2% [38] and 70% [45] in two different surveys performed in Côte d'Ivoire and 49.7% in Mali [46]. Two other field studies showed a prevalence of 49% [31] and 84% [37] in Nigeria, while only one small-scale cohort screened in Liberia [31] indicated a frequency of the parasite of ~70%. All these epidemiological data point to the high prevalence of the parasite in Africa, with an average of over 50% in numerous countries. It is thus clear that significant prevalence values in African developing countries are associated with fecal peril in link with precarious sanitary conditions and quality of drinking water. Moreover, promiscuity in schools is an additional factor that could likely facilitate the transmission of the parasite.

Table 4. Prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in African countries.

African Region/Countries	Prevalence	Subtyped Isolates	Subtyping Method	<i>Blastocystis</i> sp. STs								Mixed Infection	Reference	
				ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST10			ST14
North Africa														
Tunisia	NA ^a	61	Sequencing	18	10	31	1	0	0	1	0	0	0	[47]
Libya	28.0%	38	Sequencing	19	3	15	0	0	0	1	0	0	0	[31]
Libya	NA ^a	48	Sequencing	26	13	9	0	0	0	0	0	0	0	[48]
Egypt	NA ^a	36	PCR-STs ^b	6	0	30	0	0	0	0	0	0	0	[49]
Egypt	NA ^a	110	PCR-STs ^b	15	0	49	0	0	33	13	0	0	0	[50]
Egypt	NA ^a	33	Sequencing	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	[51]
Egypt	NA ^a	21	Sequencing	4	4	13	0	0	0	0	0	0	0	[36]
Egypt	NA ^a	44	PCR-STs ^b	8	0	24	0	0	8	4	0	0	0	[52]
Total		391		96	30	204	1	0	41	19	0	0	0	
West Africa														
Nigeria	84.0%	127	Sequencing	51	42	33	0	0	0	1	0	0	0	[37]
Nigeria	49.0%	22	Sequencing	10	0	9	3	0	0	0	0	0	1	[31]
Côte d'Ivoire	58.2%	64	Sequencing	32	14	18	0	0	0	0	0	0	0	[38]
Côte d'Ivoire	70.0%	0	NA ^a	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[45]
Liberia	70.0%	25	Sequencing	7	7	8	3	0	0	0	0	0	5	[31]
Senegal	80.4%	453	Sequencing	113	226	107	0	0	0	3	2	2	135	Present study
Senegal	100%	103	Sequencing	29	21	51	2	0	0	0	0	0	0	[12]
Mali	49.7%	0	NA ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[46]
Total		794		242	310	226	8	0	0	4	2	2	141	
Central Africa														
Angola	25.6%	75	Sequencing	23	23	27	0	1	0	1	0	0	0	[42]
Cameroon	88.2%	65	Sequencing	23	9	33	0	0	0	0	0	0	0	[13]
Total		140		46	32	60	0	1	0	1	0	0	0	
East Africa														
Tanzania	81.8%	34	Metagenomics	11	13	10	0	0	0	0	0	0	0	[13]
Tanzania	55.6%	15	Metagenomics	1	12	2	0	0	0	0	0	0	0	[43]
Tanzania	60.9%	92	Sequencing	36	28	27	0	0	0	1	0	0	0	[41]
Tanzania	NA ^a	6	Sequencing	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	[53]
Total		147		19	56	41	0	0	0	1	0	0	0	
Southern Africa														
Madagascar	64.5%	158	Sequencing	80	36	42	0	0	0	0	0	0	13	[44]
Total		158		80	36	42	0	0	0	0	0	0	13	
Grand total		1630		513	464	573	9	1	41	25	2	2	154	

^a NA, not applicable. ^b STs, subtype-specific sequence-tagged site.

At the regional level, the prevalence of *Blastocystis* sp. was of the same order of importance between the two Senegalese study areas of Saint-Louis (83.5%) and Lake Guiers (77.4%). Nevertheless, a large variation was reported between villages of these two areas that could scarcely be explained by differences in sanitary conditions encountered in the villages. Indeed, the habitat is of urban type in all the villages and all inhabitants use latrines. In contrast, various origins of water sources for drinking, domestic activities, and irrigated crops potentially contaminated with human and animal feces might account for the observed variation of the waterborne parasite frequency. For instance, the highest prevalence of *Blastocystis* sp. has been reported in the village of Ndiawdoune. Within the area of Saint-Louis, this is the only village to be located on the banks of the Ngalam River (Table 1), which might exhibit a potential higher level of contamination by the parasite than the Senegal River or the Lampsar River. Regarding the villages of the area of Lake Guiers, the water sources tended to be more diversified than for the area of Saint-Louis (Table 1), even though the lake water represents the main one. Interestingly, the prevalence of *Blastocystis* sp. gradually increased in villages located from north to south of the Lake Guiers. Indeed, Mbane, the northernmost village, exhibited a prevalence of 51.7% followed to the south by Diokhor Tack (76%) and then further south by the villages of Foss, Malla, and Malla Tack with a prevalence reaching or exceeding 90%. Interestingly, Mbane is the closest to the geographical zone in which the lake is supplied by the Taouey River. In this zone, stagnation of water together with fecal debris could likely be reduced, leading to a more limited contamination of the villagers. In addition, Mbane is the only village of this area with tap water unlike the inhabitants of other villages in the same area whose main water supply is the lake. Moreover, lake water flowing to villages further north within a closed aquatic system could stagnate and accumulate fecal debris from villages located further south and thus potentially increase the risk of infection by *Blastocystis* sp. This stagnation in the vicinity of the water points of these villages is also important because of the extreme density of aquatic vegetation on the shores of the lake. These hypotheses remain to be further confirmed through the search for the parasite in water samples collected near the Senegalese villages.

Within our overall Senegalese cohort, ST2 was largely predominant (49.9% of the subtyped isolates) followed by ST1 (24.9%) and ST3 (23.6%). Additional STs including ST7 (0.7%), ST10, and ST14 (both 0.45%) were poorly represented. This ST distribution could first be compared with that observed in a previous survey conducted in children of the Podor district in Senegal, reporting the predominance of ST3 followed by ST1 and ST2 [12]. In other West African countries like Nigeria [31,37] and Côte d'Ivoire [38], ST1 was the

predominant variant followed by either ST2 or ST3. Variation in ST distribution was also observed between other African regions as ST3 was predominant in Central [13,42] and North [36,47,49–51] Africa, with the exception of Libya, where ST1 was the most frequent ST [31,48] as in Southern Africa [44]. Although all these data were often based on a limited number of individuals, a geographical variation in the frequency of the three major STs was reported between African regions or within the same country that might simply reflect different exposure to environmental and/or animal infection sources. This variation was also described within the same region as shown in the present survey in the zone of Saint-Louis. Indeed, ST3 was the most commonly detected ST in the area of Saint-Louis while it was ST2 in the area of Lake Guiers. Still, in West Africa, but in Nigeria, ST2 was the second most identified ST after ST1 in a community living in the town of Ilero (Oyo state) [37], while ST2 was surprisingly not detected in samples collected in patients attending a clinic in Lagos (Lagos state) [31].

Overall, ST1, ST2, and ST3 isolates represent the huge majority of human isolates identified in Senegal and more generally in Africa with 95.1% (1550/1630) of the total of isolates subtyped until now on this continent, together with an overall predominance of ST3. As these three STs are frequently found in the human population and globally more rarely in animals [4], it can be concluded that ST1 to ST3 infections in humans are mostly the result of large-scale human-to-human transmission, which can be reasonably enhanced in low-income countries such as Senegal in which an increase in the number of cases of waterborne illnesses of humans and animals living in the Senegal River Basin has been reported in the last years [54]. Interestingly, ST4 has not been identified in the present epidemiological survey and a total of only nine ST4 isolates have been characterized in Africa out of the 1630 isolates subtyped so far on this continent (0.55%) (Table 3). In contrast, ST4 appears to be common, primarily in Europe [8,31,39]. Our observations therefore support the hypothesis that ST4 entered the human population in the recent past in comparison to others STs [18]. However, the potential zoonotic source of this ST4 emergence likely in the European population still remains unknown.

In Senegal, three cases of ST7 infection were identified in our study, all of them in the area of Saint-Louis. It has been confirmed that ST6 and ST7 represent avian-adapted STs in view of their large predominance in birds [35]. In Africa, these two STs together represent only ~4% (66/1630) of the human isolates subtyped (Table 3), confirming that “avian STs” are rare in humans outside of Asia [18,19]. The most likely origin of these ST7 isolates is zoonotic from farm poultry but the mode of transmission between hosts is not conclusively

demonstrated. Indeed, it can occur either through intimate contact of humans with animals (fecal–oral route) or through consumption of water or food contaminated with bird feces. To complete this overview, ST10 and ST14 were identified in four school children living in different villages, indicating independent sources of contamination. Numerous studies have reported that ST10 and ST14 were largely predominant in bovid, confirming that both STs could be considered as adapted to this animal group [55,56]. However, despite the high prevalence of these two STs in bovid and potential long-term and repeated contact with these animals, especially for farmers, ST10 and ST14 had never been documented in human infections worldwide prior to this survey [18,19]. As for ST7, the mode of transmission of ST10 and ST14 to humans remains speculative and may be through either direct contact with livestock or waterborne transmission, as ST10 has already been detected in river water samples collected for instance in Peninsular Malaysia [57].

Due to the large number of isolates subtyped herein, the intra-ST diversity of the three major STs identified in our Senegalese cohort (ST1 to ST3) could be thoroughly investigated. Strikingly, these three STs appeared very different in terms of their intra-ST variation that was evaluated through the ratio between the number of isolates and the number of genotypes from each ST (Table 3). In case of ST1, 15 genotypes were reported with an average of 7.5 isolates per genotype. Regarding ST2, 20 genotypes were registered, thus suggesting a greater intra-ST genetic diversity than ST1. However, the ratio between the number of isolates and the number of ST2 genotypes reached 11.3, rebutting this assumption. Noticeably, ST3 exhibited the lower intra-ST diversity as only eight genotypes were identified with an average of 13.8 isolates per genotype. For comparison, very few studies have previously focused on the intra-ST genetic diversity among these three major STs and almost all were based on the analysis of sequences from another domain of the SSU rDNA gene than the one targeted in our study [18,40]. Through the analysis of this second marker, it was also reported that genetic diversity could vary dramatically at the intra-ST level in epidemiological surveys conducted for instance in China [58] and Nigeria [37]. Indeed, ST2 was shown to exhibit the greater intra-ST diversity (average of 2.2 isolates per genotype) followed by ST1 (6.7) then ST3 (21.5) in the Chinese study. In Nigeria, ST3 was far more divergent (5.6) then ST2 (13) and ST1 (20). Interestingly, intra-ST diversity also largely fluctuated between different geographical regions within the same country as shown from two studies conducted in Colombia. In one of these surveys [59], the greater intra-ST diversity was reported for ST2 (7) followed by ST1 (9.2) and ST3 (15.8), while in the second [17], ST2 was the most divergent ST (4.2) ahead of ST3 (4.7) and ST1 (9.6). Globally, our

data coupled with those obtained these previous studies highlighted the lower intra-ST genetic diversity of ST3 compared to ST1 and ST2. Interestingly, this was confirmed through the comparative analysis of a large number of draft *Blastocystis* sp. genomes reconstructed from shotgun metagenomics data [43].

It is known that ST1 and ST2 can colonize different groups of animals while ST3 is mainly found in humans [4]. This highlighted the relatively high host specificity within ST3 as previously proposed [40], strongly suggesting that most ST3 infections in humans are caused predominantly by anthroponotic transmission. This was emphasized in the present study as three of the eight ST3 genotypes identified represented more than 90% of ST3 isolates. Consequently, the remaining five ST3 genotypes including only one to three isolates were likely of external source. In contrast, numerous genotypes identified in the Senegalese population and belonging to either ST1 or ST2 were represented by only one isolate, implying a possible concurrent exposure of the villagers to different sources of infection or few sources containing several genotypes. These potential sources could therefore be multiple and particular to some villages as described for instance in Ndiol Maure and Malla Tack. In Ndiol Maure, seven of the 11 ST1 genotypes were represented by a single isolate and were only detected in this village. Similarly, among the 12 ST2 genotypes reported in Malla Tack, seven of them including only one isolate were uniquely found in that village. Consequently, even if part of the ST1 and ST2 infections occurs through human-to-human transmission in our Senegalese cohort, a large proportion would be the result of sporadic contamination from different well-located sources that remain to be determined. Future studies should be conducted to detect the presence of the parasite in animal and environmental samples collected from the corresponding villages.

5. Conclusions

The present survey completes the still insufficient data available for the African continent regarding *Blastocystis* sp.. The prevalence observed in our Senegalese cohort is extremely high as it exceeds 80%. Such prevalence is most probably linked to widespread and active transmission of the parasite due to precarious sanitary and hygiene conditions within the population and exposure to various contaminated environmental sources. Interestingly, the analysis of the intra-ST genetic diversity of the three main STs identified herein strongly suggests that the predominant ST3 is mainly transmitted by the inter-human route, whereas several sources of transmission occur for ST1 and ST2. Consequently, *Blastocystis* sp. may be a good sentinel for the detection of water contamination. It is also

shown that the isolates considered with certainty to be of animal origin (ST7, ST10, and ST14) are in rather limited numbers in Senegal, highlighting the low risk of zoonotic transmission in this country as more globally in Africa. Finally, this large-scale field survey also provides valuable information to the local health authorities to implement urgent prevention and control measures in order to significantly reduce the incidence of *Blastocystis* sp. in this part of the world.

Author Contributions: Conceptualization, A.-M.S., G.R., and E.V.; Formal analysis, S.K., N.G., A.T.L., S.S., E.D., R.D., and S.N.; Funding acquisition, G.C., G.R., and E.V.; Investigation, S.K., N.G., A.T.L., S.S., G.E., E.D., R.D., M.S., M.B., S.B.V., M.C., S.N., and E.V.; Project administration, A.-M.S., G.R., and E.V.; Resources, A.T.L., S.S., and E.V.; Software, S.K., N.G., G.E., and E.V.; Supervision, A.-M.S., G.C., G.R., and E.V.; Validation, G.C. and E.V.; Writing—original draft, E.V.; Writing—review and editing, S.K., N.G., M.S., M.C., G.C., G.R., and E.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Institut Pasteur of Lille, the University of Lille, the University Catholic of Lille, the CHRU of Lille and the Biomedical Research Center Espoir pour—la Santé. SK and MS were supported by PhD fellowships from the AZM & Saade Association of Lebanon and University of Lille, respectively.

Acknowledgments: The authors are grateful to all those who participated in the study and the staff of the Biomedical Research Center Espoir Pour La Santé (BRC-EPLS), especially Rokhaya Diagne for the collection of samples and the preparation of listings

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Boreham, P.F.L.; Stenzel, D.J. *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.* **1993**, *32*, 1–70.
2. Tan, K.S.W. *Blastocystis* in humans and animals: New insights using modern methodologies. *Vet. Parasitol.* **2004**, *126*, 121–144.
3. Yoshikawa, H.; Koyama, Y.; Tsuchiya, E.; Takami, K. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 750–759.
4. 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. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169659.
5. Tan, K.S.W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 639–665.
6. Scanlan, P.D.; Stensvold, C.R. *Blastocystis*: Getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* **2013**, *29*, 523–529.
7. 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*, 391–396.
8. El Safadi, D.; Cian, A.; Nourrisson, C.; Pereira, B.; Morelle, C.; Bastien, P.; Bellanger, A.P.; Botterel, F.; Candolfi, E.; Desoubieux, G.; et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 451.
9. Menu, E.; Mary, C.; Toga, I.; Raoult, D.; Ranque, S.; Bittar, F. A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e100, 1–8.
10. Bart, A.; Wentink-Bonnema, E.M.S.; Gilis, H.; Verhaar, N.; Wassenaar, C.J.A.; van Vugt, M.; Goorhuis, A.; Van Gool, T. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 389.
11. Muadica, A.S.; Köster, P.C.; Dashti, A.; Bailo, B.; Hernandez-de-Mingo, M.; Reh, L.; Balasegaram, S.; Verlander, N.Q.; Chercoles, Ruiz Chercoles, E.; Carmena, D. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms* **2020**, *8*, 466.

12. El Safadi, D.; Gaayeb, L.; Meloni, D.; Cian, A.; Poirier, P.; Wawrzyniak, I.; Delbac, F.; Dabboussi, F.; Delhaes, L.; Seck, M.; et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 164.
13. Lokmer, A.; Cian, A.; Froment, A.; Gantois, N.; Viscogliosi, E.; Chabé, M.; Ségurel, L. Use of shotgun metagenomics for the identification of protozoa in the gut microbiota of healthy individuals from worldwide populations with various industrialization levels. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211139.
14. Osman, M.; El Safadi, D.; Cian, A.; Benamrouz, S.; Nourrisson, C.; Poirier, P.; Pereira, B.; Razakandrainibe, R.; Pinon, A.; Lambert, C.; et al. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004496.
15. Noradilah, S.A.; Moktar, N.; Anuar, T.S.; Lee, I.L.; Salleh, F.M.; Manap, S.N.A.A.; Mohtar, N.S.H.M.; Azrul, S.M.; Abdullah, W.O.; Nordin, A.; et al. Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: Does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 360.
16. Rojas-Velazquez, L.; Maloney, J.G.; Molokin, A.; Moran, P.; Serrano-Vazquez, A.; Gonzalez, E.; Perez-Juarez, H.; Ximenez, C.; Santin, M. Use of next-generation amplicon sequencing to study *Blastocystis* genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 566
17. Higuera, A.; Villamizar, X.; Herrera, G.; Giraldo, J.C.; Vasquez-A.; L.R.; Urbano, P.; Villalobos, O.; Tovar, C.; Ramirez, J.D. Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ* **2020**, *8*, e8554.
18. Clark, C.G.; van der Giezen, M.; Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* **2013**, *82*, 1–32.
19. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* **2016**, *65*, 763–771.
20. Kurt, Ö.; Dogruman Al, F.; Tanyüksel, M. Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 797–801.
21. Fréal, E.; El Safadi, D.; Cian, A.; Aubry, E.; Certad, G.; Osman, M.; Wacrenier, A.; Dutoit, E.; Creusy, C.; Dubos, F.; et al. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 91–94.

22. Lepczynska, M.; Chen, W.C.; Dzika, E. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int. J. Derm.* **2015**, *55*, 259–266.
23. Ajjampur, S.S.; Tan, K.S.W. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp.-Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 772–779.
24. Noël, 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. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 348–355.
25. Stensvold, C.R.; Suresh, G.K.; Tan, K.S.; Thompson, R.C.; Traub, R.J.; Viscogliosi, E.; Yoshikawa, H.; Clark, C.G. Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol.* **2007**, *23*, 93–96.
26. Alfellani, M.A.; Taner-Mulla, D.; Jacob, A.S.; Imeede, C.A.; Yoshikawa, H.; Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* **2013**, *164*, 497–509.
27. Zhao, G.H.; Hu, X.F.; Liu, T.L.; Hu, R.S.; Yu, Z.Q.; Yang, W.B.; Wu, Y.L.; Yu, S.K.; Song, J.K. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 2327–2333.
28. Maloney, J.G.; Lombard, J.E.; Urie, N.J.; Shivley, C.B.; Santin, M. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US preweaned dairy heifer calves. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 575–582.
29. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Pre-empting Pandora's box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 229–232.
30. Gantois, N.; Lamot, A.; Seesao, Y.; Creusy, C.; Li, L.L.; Monchy, S.; Benamrouz-Vanneste, S.; Karpouzopoulos, J.; Bourgain, J.L.; Rault, C.; et al. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in edible marine fish and marine mammals: A large-scale study conducted in Atlantic Northeast and on the coasts of Northern France. *Microorganisms* **2020**, *8*, 460.
31. Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R.; Vidal-Lapiedra, A.; Onuoha, E.S.; Fagbenro-Beyioku, A.F.; Clark, C.G. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* **2013**, *126*, 11–18.
32. Ramírez, J.D.; Sánchez, A.; Hernández, C.; Florez, C.; Bernal, M.C.; Giraldo, J.C.; Reyes, P.; Lopez, M.C.; Garcia, L.; Cooper, P.J.; et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *41*, 32–35.

33. Stensvold, C.R.; Alfellani, M.A.; Norskov-Lauritsen, S.; Prip, K.; Victory, E.L.; Maddox, C.; Nielsen, H.V.; Clark, C.G. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 473–479.
34. Wang, W.; Owen, H.; Traub, R.J.; Cuttell, L.; Inpankaew, T.; Bielefeldt-Ohmann, H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* **2014**, *203*, 264–269.
35. Greige, S.; El Safadi, D.; Bécu, N.; Gantois, N.; Pereira, B.; Chabé, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; Certad, G.; El Hage, R.; Chemaly, M.; et al. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 389.
36. Souppart, L.; Moussa, H.; Cian, A.; Sancier, G.; Poirier, P.; El Alaoui, H.; Delbac, F.; Boorom, K.; Delhaes, L.; Dei-Cas, E.; et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol. Res.* **2010**, *106*, 505–511.
37. Poulsen, C.S.; Efunshile, A.; Nelson, J.A.; Stensvold, C.R. Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 175–179.
38. D'Alfonso, R.; Santoro, M.; Essi, D.; Monsia, A.; Kaboré, Y.; Glé, C.; Di Cave, D.; Sorge, R.P.; Di Cristianzano, V.; Berrilli, F. *Blastocystis* in Côte d'Ivoire: Molecular identification and epidemiological data. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 2243–2250.
39. Poirier, P.; Wawrzyniak, I.; Albert, A.; El Alaoui, H.; Delbac, F.; Livrelli, V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 975–983.
40. Stensvold, C.R.; Alfellani, M.; Clark, C.G. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 263–273.
41. Forsell, J.; Granlund, M.; Samuelsson, L.; Koskiniemi, S.; Edebro, H.; Evengard, B. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1–3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasit Vectors* **2016**, *9*, 370.
42. Dacal, E.; Saugar, J.M.; de Lucio, A.; Hernandez-de-Mingo, M.; Robinson, E.; Köster, P.C.; Aznar-Ruiz-de-Alegria, M.L.; Espasa, M.; Ninda, A.; Gandasegui, J.; et al. Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*,

Cryptosporidium spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 67.

43. Beghini, F.; Pasolli, E.; Truong, T.D.; Putignani, L.; Caccio, S.M.; Segata, N. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *Isme J.* **2017**, *11*, 2848–2863.
44. Greigert, V.; Abou-Bacar, A.; Brunet, J.; Nourrisson, C.; Pfaff, A.W.; Benarbia, L.; Pereira, B.; Randrianariveolosia, M.; Razafindrakoto, J.-L.; Rakotomalala, R.S.; et al. Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204576.
45. Lebba, V.; Santangelo, F.; Totino, V.; Pantanella, F.; Monsia, A.; Di Cristanziano, V.; Di Cave, D.; Schippa, S.; Berrilli, F.; D'Alfonso, R. Gut microbiota related to *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp. and *Blastocystis hominis* infections in humans from Côte d'Ivoire. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2016**, *10*, 1035–1041.
46. Kodio, A.; Coulibaly, D.; Kassoum Koné, A.; Konaté, S.; Doumbo, S.; Guindo, A.; Bittar, F.; Gouriet, F.; Raoult, D.; Aly Thera, M.; et al. *Blastocystis* colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy Malian children. *Microorganisms* **2019**, *7*, 649.
47. Ben Abda, I.; Maatoug, N.; Ben Romdhane, R.; Bouhelmi, N.; Zallegua, N.; Aoun, K.; Viscogliosi, E.; Bouratbine, A. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis area, Tunisia. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* **2017**, *96*, 202–204.
48. Abdulsalam, A.M.; Ithoi, I.; Al-Mekhlafi, H.M.; Al-Mekhlafi, A.M.; Ahmed, A.; Surin, J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84372.
49. El Deeb, H.K.; Khodeer, S. *Blastocystis* spp.: Frequency and subtype distribution in iron deficiency anemic versus non-anemic subjects from Egypt. *J. Parasitol.* **2013**, *99*, 599–602.
50. Fouad, S.A.; Basyoni, M.M.A.; Fahmy, R.A.; Kobaisi, M.H. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *ArabJ. Gastroenterol.* **2011**, *12*, 194–200.
51. Hameed, D.M.A.; Hassanin, O.M.; Zuel-Fakkar, N.M. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol. Res.* **2011**, *108*, 553–560.
52. Hussein, E.M.; Hussein, A.M.; Eida, M.M.; Atwa, M.M. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol. Res.* **2008**, *102*, 853–860.

53. Petrasova, J.; Uzlikova, M.; Kostka, M.; Petrzekova, K.J.; Huffman, M.A.; Modry, D. Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 1113–1120.
54. Remy, M.; Sondaz, D.; Philip, J.; Calvet, F.; Daoud, W. Drainage basin of the Senegal River, sanitary conditions in 2010. Part I: Illnesses directly linked to the water. *Médecine Trop. Revue Corps Santé Colonial* **2011**, *71*, 123–128.
55. Zhu, W.; Tao, W.; Gong, B.; Yang, H.; Li, Y.; Song, M.; Lu, Y.; Li, W. First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. *Vet. Parasitol.* **2017**, *246*, 38–42.
56. Greige, S.; El Safadi, D.; Khaled, S.; Gantois, N.; Baydoun, M.; Chemaly, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; Chabé, M.; Osman, M.; Certad, G.; et al. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission. *Acta Trop.* **2019**, *194*, 23–29.
57. Noradilah, S.A.; Lee, I.L.; Anuar, T.S.; Salleh, F.M.; Abdul Manap, S.N.; Mohd Mohtar, N.S.; Azrul, S.M.; Abdullah, W.O.; Moktar, N. Occurrence of *Blastocystis* sp. in water catchments at Malay villages and Aboriginal settlement during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. *Peerj.* **2016**, *4*, e2541.
58. Qi, M.; Wei, Z.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Li, J.; Zhang, L.; Wang, R. Genetic diversity of *Blastocystis* in kindergarten children in southern Xinjiang, China. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 15.
59. Ramirez, J.D.; Florez, C.; Olivera, M.; Bernal, M.C.; Giraldo, J.C. *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172586.

2. Prévalence et distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. chez les vaches laitières au Liban et évaluation de son potentiel zoonotique

Cette étude fait l'objet d'un article publié dans la revue « Acta Tropica ».

First report of prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission risk

Salma Khaled*, Stéphanie Greige*, Dima El Safadi*, Nausica Gantois, Martha Baydoun, Marianne Chemaly, Sadia Benamrouz-Vanneste, Magali Chabé, Marwan Osman, Gabriela Certad, Monzer Hamze, Eric Viscogliosi

Acta Tropica 2019, 194, 23-29

* Co-premiers auteurs

a. Contribution de la candidate à l'étude

- Collecte des échantillons humains et animaux sur le terrain et des données cliniques des individus
- Management et organisation de la collection d'échantillons
- Réalisation des expériences de biologie moléculaire et analyse des séquences
- Interprétation des données obtenues
- Rédaction de l'article

b. Résumé de l'étude

Blastocystis sp. est fréquemment identifié chez de nombreux hôtes animaux, y compris les bovins. En raison de son potentiel zoonotique, ce parasite a été recherché chez des bovins domestiques dans différents pays puisque ce bétail peut également représenter un réservoir d'infection possible pour l'Homme. Cependant, aucune donnée épidémiologique concernant la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans ce groupe d'animaux d'importance économique majeure n'était disponible au Liban. Par conséquent, des échantillons de matières fécales ont été collectés pour un total de 254 vaches laitières élevées dans 55 exploitations localisées dans 37 villages des deux gouvernorats de la région du Nord-Liban. En parallèle, et pour évaluer le potentiel zoonotique du parasite, 40 selles de

fermiers en contact avec ces animaux et 40 selles de patients hospitalisés pour différentes pathologies à l'hôpital de Tripoli et n'ayant pas de contact direct avec ces animaux ont été obtenues.

Comme pour l'étude précédente, *Blastocystis* sp. a été recherché dans les échantillons animaux par PCR en temps réel. La prévalence globale du parasite était de l'ordre de 63% chez le bétail. L'analyse des séquences des échantillons positifs indiquait la présence de 7 STs avec une prédominance du ST10 (44,0%) et du ST14 (36,8%) et des proportions nettement plus faibles pour le ST2 (8,0%), le ST1 (7,2%), le ST5 (2,4%) et les ST3 et ST7 (0,8% chacun). Cette enquête était la première à identifier les ST2 et ST7 chez les bovins domestiques et a confirmé que les ST10 et ST14 représentaient des STs adaptés aux bovins en raison de leur prédominance.

Chez les éleveurs, la prévalence du parasite par PCR en temps réel était de 52,5% et celle observée chez les patients hospitalisés était du même ordre de grandeur (57,5%). Ces données étaient très similaires aux prévalences déterminées précédemment au Liban dans différentes cohortes humaines indiquant que la prévalence du parasite est très élevée dans cette région du Liban quelle que soit sans doute la classe socio-professionnelle des individus et ce en lien probablement avec la vétusté du réseau de distribution d'eau. Les trois mêmes STs ont été identifiés dans les deux cohortes humaines, avec une prédominance du ST3 suivie du ST1 ou du ST2 selon le groupe considéré. Aucun autre ST comme le ST10 ou le ST14 n'a été signalé dans ces deux cohortes humaines. De plus, même si quelques isolats de ST1, ST2 et ST3 ont été identifiés à la fois chez les vaches laitières et chez les éleveurs, un seul isolat de ST3 présentait une parfaite identité de séquence entre les deux hôtes, suggérant une transmission de l'Homme à l'animal du fait de la prédominance du ST3 dans la population humaine libanaise.

La présence et la faible prévalence des ST1, ST2, ST3, ST5 et ST7 identifiés chez les vaches laitières et dont la plupart présentent une faible spécificité d'hôte pourraient être liées à une exposition occasionnelle à des matières fécales humaines ou animales diverses ou par ingestion d'eau potable ou d'aliments contaminés dans l'enceinte des exploitations. Par conséquent, du fait de l'absence des ST10 et ST14 dans la population Libanaise, ces données montraient que les vaches laitières jouaient probablement un rôle négligeable en tant que réservoirs zoonotiques pour *Blastocystis* sp.

First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission risk

Stéphanie Greige^{a,b,1}, Dima El Safadi^{a,b,1}, Salma Khaled^{a,b,1}, Nausicaa Gantois^a, Martha Baydoun^a, Marianne Chemaly^c, Sadia Benamrouz-Vanneste^a, Magali Chabé^a, Marwan Osman^b, Gabriela Certad^{a,d}, Monzer Hamze^b, Eric Viscogliosi^{a*}

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

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

^c ANSES, Ploufragan-Plouzané Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, Bretagne-Loire University, Ploufragan, France

^d Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille, Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, 51 Boulevard de Belfort, 59000 Lille, France

* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 87 79 61; fax: +33 3 20 87 78 88

E-mail address: eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr (E. Viscogliosi)

¹ Equal contributors

Abstract

Blastocystis sp. is one of the most common gut-dwelling protozoans colonising humans worldwide, while also being frequently identified in a wide range of animal hosts, including bovids. Because of its burden and zoonotic potential, this parasite has been sought in domestic cattle from various countries, since this livestock may also represent a possible reservoir of human infection. However, epidemiological data regarding the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in this animal group of major economic importance is lacking in Lebanon. Therefore, faecal samples were collected from a total of 254 dairy cattle raised on 55 farms located in the North Lebanon region and screened for the presence of the parasite by quantitative real-time PCR targeting the small subunit rDNA gene. The overall prevalence of *Blastocystis* sp. was shown to reach 63.4% in cattle livestock. Sequence analysis of positive samples indicated the presence of seven STs, with predominance of ST10 (44.0%) and ST14 (36.8%) and lower proportions of ST2 (8.0%), ST1 (7.2%), ST5 (2.4%), ST3 and ST7 (0.8% each). This survey was the first conducted worldwide reporting ST2 and ST7 in domestic cattle and confirmed that ST10 and ST14 represent cattle-adapted STs in view of their high prevalence. To explore the zoonotic potential of the parasite, faecal samples from in-contact breeders and patients hospitalised in the same Lebanese governorate who reported no contact with cattle livestock were also analysed for the presence of *Blastocystis* sp. The same three STs were identified in both human cohorts, with predominance of ST3, followed either by ST1 or ST2 depending of the group. No other STs, including ST10 or ST14, have been reported. Moreover, even though ST1, ST2 and ST3 were found to be common to dairy cattle and breeders cohorts, only one ST3 isolate showed 100% sequence identity between both hosts, strongly suggesting reverse zoonosis from handlers to animal according to the predominance of this ST in the human population. In our opinion, the presence and low prevalence of ST1, ST2, ST3, ST5 and ST7 identified herein in domestic cattle, most of which exhibit low host specificity, could be derived from occasional direct exposure to faecal material from human and non-human hosts or by ingestion of contaminated drinking water or food in the enclosure of the farms. Consequently, together with the absence of ST10 and ST14 in the human population, these data suggest that cattle play a negligible role as zoonotic reservoirs of *Blastocystis* sp.

Keywords: *Blastocystis* sp., Dairy cattle, Intestinal parasite, Molecular epidemiology, Transmission, Zoonosis

1. Introduction

Blastocystis sp. is currently the most common single-celled intestinal parasite found in humans, since its prevalence can greatly exceed 50% in developed countries (El Safadi et al., 2014; Forsell et al., 2016) and reach an average of around 20% in industrialised regions of Europe (Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016). This protozoan has also been frequently found in many groups of animals, including non-human primates and various groups of mammals, birds, reptiles, amphibians and insects (Tan, 2004; Stensvold and Clark, 2016; Yoshikawa et al., 2016; Cian et al., 2017). The principal mode of transmission of *Blastocystis* sp. is the faecal-oral route, essentially through consumption of water or food contaminated by environmentally resistant cystic forms of the parasite (Tan, 2008). Due to the very common asymptomatic carriage of the parasite in the human population worldwide, its pathogenic potential and clinical significance remains uncertain (Andersen and Stensvold, 2016), even though numerous recent *in vitro* studies have identified the mechanisms and molecules involved in the virulence of the parasite (Clark et al., 2013; Wawrzyniak et al., 2013; Ajjampur and Tan, 2016; Stensvold and Clark, 2016). Moreover, recent data suggest that colonisation by the parasite is associated with certain intestinal bacterial communities in the host (Andersen et al., 2015; Audebert et al., 2016; Forsell et al., 2017). *Blastocystis* sp. infection would thus be associated with various gastrointestinal disorders (Tan, 2008; Tan et al., 2010) and/or urticaria (Lepczynska et al., 2015) in numerous human clinical cases.

An extensive genetic diversity has been demonstrated within the genus *Blastocystis* based on the comparison of small subunit (SSU) rDNA gene sequences (Noël et al., 2005; Stensvold et al., 2007a). Indeed, 17 subtypes (STs) have been identified so far in mammalian and avian hosts (Alfellani et al., 2013a), ten of which infect humans with varying prevalence (Alfellani et al., 2013b; Clark et al., 2013; Ramirez et al., 2016; Stensvold and Clark, 2016). Briefly, more than 90% of human isolates belong to ST1 to ST4, in large part likely related to human-to-human transmission (Alfellani et al., 2013b; Clark et al., 2013). Most other STs found in the human population are considered to be of animal origin, with low host specificity and are potentially zoonotic. For instance, ST5 frequently infects pigs, whereas ST6 and ST7 are predominant in birds (Cian et al., 2017). Based on large-scale epidemiological surveys, these last STs were considered to be pig- and avian-adapted STs respectively, and corresponding isolates were shown to be possibly transmitted from these animals to their in-contact workers at intensive commercial piggeries and poultry slaughterhouses (Wang et al., 2014; Greige et al., 2018). In addition, ST8, which is common in non-human primates, was identified with unexpected high prevalence in their keepers

(Stensvold et al., 2009). In view of these data, it became necessary to determine the infection rate and ST distribution of *Blastocystis* sp. in other animal groups, such as bovids and particularly livestock cattle. In the main recent molecular epidemiological surveys including a large number of specimens (Zhu et al., 2017; Lee et al., 2018; Masuda et al., 2018; Wang et al., 2018), the prevalence of the parasite in domestic dairy/beef cattle varied between 6.7% and 54.1%, depending on the country. The potential significant occurrence of *Blastocystis* sp. in livestock cattle could thus induce a risk of zoonotic transmission, especially in breeders. Moreover, the same molecular studies and a few others identified ST10 and ST14 as the predominant STs in cattle, likely reflecting bovids as natural hosts for both STs (Cian et al., 2017; Zhu et al., 2017; Masuda et al., 2018). Strikingly, ST10 and ST14 have never yet been reported in human infections, suggesting minimal risk of zoonotic transmission (Cian et al., 2017; Wang et al., 2018). However, neither of these STs has so far been sought in cattle and their in-contact breeders to confirm this hypothesis.

The objectives of this study was thus to obtain the first molecular data regarding the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon. A particular purpose was to confirm that bovids represent natural hosts of ST10 and ST14. In addition, the risk of zoonotic transmission of the parasite was assessed through a comparative analysis of the ST distribution of isolates identified in dairy cattle and in-contact breeders, as well as in individuals reporting no contact with these animals.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The protocol of this study was approved by the Lebanese Minister of Public Health with reference number 2014/4/39716 and by the research ethics committee of Hamidi Medical Centre in Tripoli, Lebanon, with reference number Hamidi-7-2017. Oral and written informed consent was obtained from all subjects included in this study after a clear explanation of the research objectives prior to enrolment. The subjects' data were collected anonymously (with encryption of the identity of individuals). This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). All dairy cattle samples were collected under the supervision of the breeders. No approval from the Institutional Animal Care and Use Committee or ethics committee was necessary, as no invasive sampling approach was performed.

2.2. Study sites and sample collection

The study was conducted in the two governorates comprising the North Lebanon region, namely Akkar and North governorates, the latter including the regional capital Tripoli (Figure 1). All healthy adult dairy cattle included in this study were older than 12 months and were of the Holstein-Friesian breed (*Bos taurus*). In Akkar governorate, 157 faecal specimens were randomly collected from 22 villages and 36 farms from July to November 2016. In order to obtain epidemiological data from dairy cattle in different geographical areas in Lebanon, 97 samples were also randomly obtained from 15 villages and 19 farms from July to November 2017 in North governorate, for an overall total of 254 cattle samples screened in this survey (one specimen per animal). Briefly, faecal samples were collected in the early morning with the assistance of the breeders and veterinarians. Specimens were either collected directly from the rectum of the animal with a gloved hand or directly from the ground immediately after defecation to prevent potential contamination between animals. Each fresh faecal sample was recovered in a sterile plastic container, respecting the conditions of asepsis and hygiene. The containers were stored in ice and then immediately transported to the LMSE at the AZM Centre in Tripoli. To evaluate the zoonotic potential of *Blastocystis* sp. isolates identified in dairy cattle, human stool samples were obtained during the same period from 40 breeders working at the same 19 dairy cattle farms located in North governorate and from 40 individuals followed up for different pathologies or who presented for routine medical check-ups at Hamidi Medical Centre in Tripoli who reported no contact with cattle (control population). A standardised questionnaire was designed to collect data of interest, such as age, sex, residency and gastrointestinal symptoms (abdominal pain, bloating, constipation, diarrhoea and/or vomiting) for each voluntary individual, as well as seniority as in-contact worker with cattle for the cohort of breeders.

2.3. DNA extraction

Total genomic DNA was extracted directly from approximately 250 mg of animal or human faecal samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended procedures. The DNA was eluted in 200 µl of elution buffer and stored at -20°C at the LMSE in Tripoli. The DNA samples were then transported to the Pasteur Institute in Lille (France) for molecular screening and subtyping of *Blastocystis* sp.

2.4. Detection and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates

SSU rDNA gene detection of the parasite was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) using 2 µl of extracted DNA and the *Blastocystis*-specific primer pair BL18SPPF1 / BL18SR2PP, as described previously by Poirier et al. (2011). DNA extraction controls (isolation of DNAs without stool and from a *Blastocystis* sp.-negative stool) subsequently used in qPCR assays and positive (DNA obtained from *Blastocystis* sp. ST7 strain B axenic culture maintained in the laboratory) and negative (DNA matrix replaced by water) qPCR controls were performed. The qPCR product from each positive sample was purified and sequenced in both strands by Genoscreen (Lille, France). For 3 human samples obtained from breeders and 3 others collected from patients followed at Hamidi Medical Centre in Tripoli, sequence chromatogram analysis revealed the presence of double traces, suggesting mixed infection by different STs. Mixed signals were also generated for numerous qPCR products obtained from dairy cattle samples. All 6 human samples and a selection of 9 animal samples corresponding to mixed infections were thus re-analysed by non-qPCR using the same primer pair as for qPCR. Non-qPCR amplification, as well as purification and cloning of the non-qPCR product, were performed as described previously (Cian et al., 2017). Briefly, the purified non-qPCR product cloned in the T-vector, pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) was amplified in *Escherichia coli* One Shot TOP10 competent cells and miniprepations of plasmid DNA were done using the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Five positive clones containing inserts of the expected size were selected arbitrarily and sequenced on both strands. The SSU rDNA gene sequences obtained in this study were deposited in GenBank under accession numbers MH883051 to MH883225. The sequences obtained were compared with all *Blastocystis* sp. homologous sequences available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. The STs were identified by determining the exact match or closest similarity to all known mammalian and avian *Blastocystis* sp. STs according to the most recent classification of the parasite (Alfellani et al., 2013a).

2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The chi-squared test was used to compare the *Blastocystis* sp. prevalence between the Akkar and North governorate dairy cattle groups. Fisher's exact test was used to compare the ST distribution of the parasite between the two

human cohorts, as well as those of the two animal groups. All tests were two-sided and the general significance level was set at a *P* value of below 0.05.

3. Results and discussion

A total of 254 single dairy cattle samples collected from 37 villages and 55 farms located in two governorates of North Lebanon were screened in this study (Table 1). Of these samples, 157 were obtained at Akkar governorate from cattle raised on 36 different farms. Of these 157 samples, 78.3% ($n = 123$) were identified as positive for *Blastocystis* sp. by qPCR. Of the 97 dairy cattle samples collected from 19 different farms in North governorate, 38 (39.2%) were also positive for the parasite by qPCR. The statistically significant difference of *Blastocystis* sp. prevalence in cattle between the two geographical regions (chi-squared test, $Z = 4.498$, $P < 0.05$) may possibly be due to the lower quality hygiene and sanitary conditions at farms in the rural governorate of Akkar, thus facilitating the transmission of the parasite between livestock. By combining the molecular data obtained from the two governorates, the prevalence of *Blastocystis* sp. reached 63.4% (161/254) among dairy cattle samples. This high infection rate in Lebanon was roughly similar to that observed using molecular methods in other countries, including Japan (54.1%) (Masuda et al., 2018), Thailand (50.0%) (Udonsom et al., 2018), Colombia (80.0%) (Ramirez et al., 2014) and Libya (41.7%) (Alfellani et al., 2013a) but was significantly higher than that reported in Korea (6.7%) (Lee et al., 2018), China (9.5% and 10.3%, respectively) (Zhu et al., 2017; Wang et al., 2018), Iran (9.6%) (Badparva et al., 2015), the United Kingdom (22.6%) (Alfellani et al., 2013a) and the United States (19.1%) (Fayer et al., 2012). Additional surveys also revealed a prevalence of 71.0%, 21.4% and 1.8% in Japan (Abe et al., 2002), Brazil (Franco Moura et al., 2018) and Spain (Quilez et al., 1995) respectively, using direct light microscopy of faecal smears, in the knowledge that this identification method has been shown to be less sensitive than PCR (Poirier et al., 2011). Although the prevalence of the parasite in domestic cattle may vary between geographical areas, it is nevertheless globally important worldwide, thus inducing a potential risk of transmission to in-contact humans.

To start assessing this zoonotic risk, single stool samples were collected from a total of 80 volunteers divided into two cohorts (Table 1). The first cohort included 40 individuals (26 males and 14 females), all working on dairy cattle farms in North governorate for a period of between 6 months and 30 years, with a median of 8 years, indicating a potentially long period of contact with animals. The age of the individuals in this cohort was between 22 and 65 years (mean age of 36 ± 10 years) and 21 of these 40 breeders (52.5%) were shown to be

infected with *Blastocystis* sp. by qPCR. Moreover, only 5 breeders presented gastrointestinal symptoms and 3 of them were infected by the parasite. The second cohort (or control group) consisted of 40 patients (12 males and 28 females) aged 21 to 70 years (mean age of 24 ± 12 years), hospitalised at Hamidi Medical Centre in Tripoli for various pathologies or medical check-ups, who reported no contact with cattle. 62.5% of the patients (25/40) presented one or more gastrointestinal symptoms. Using qPCR, the prevalence of *Blastocystis* sp. in this second human cohort was not significantly different to that of the breeders, i.e. 57.5% (23/40). In addition, 52.0% of symptomatic patients (13/25) were infected by the parasite. Interestingly, the infection rate observed in each of these two groups (52.5% and 57.5% respectively) was very similar to that recently reported in North Lebanon region in a large cohort of schoolchildren (63.0%) (Osman et al., 2016) and two groups of individuals working in a poultry slaughterhouse (56.0%) or hospitalised at Hamidi Medical Centre in Tripoli (54.0%) (Greige et al., 2018). On the other hand, the similar prevalence observed between all these Lebanese groups of individuals suggested that people working closely with animals, including for instance domestic cattle or poultry (Greige et al., 2018) but also pigs (Wang et al., 2014), did not systematically have a higher risk of acquiring *Blastocystis* sp. infection as previously proposed (Rajah Salim et al., 1999), without thereby jeopardising the potential zoonotic transmission of certain animal STs.

In a second step, the genetic diversity of *Blastocystis* sp. isolates was explored in dairy cattle and human cohorts. In this study, all partial SSU rDNA gene sequences obtained from animal or human samples showed 99 to 100% identity with homologous sequences available in databases allowing the direct subtyping of the corresponding isolates (Table 1). Regarding the 123 positive dairy cattle samples identified in Akkar governorate, 84 corresponded to single infections by either ST1 ($n = 4$, 3.3%), ST5 ($n = 3$, 2.4%), ST7 ($n = 1$, 0.8%), ST10 ($n = 40$, 32.5%) and ST14 ($n = 36$, 29.3%). The 39 remaining positive dairy cattle samples (31.7%) from this governorate presented mixed infections with at least 2 unidentified STs according to the resulting sequence chromatograms. Of the 38 positive animal specimens identified in North governorate, 21 corresponded to single infections with the detection of ST2 ($n = 1$, 2.6%), ST3 ($n = 1$, 2.6%), ST10 ($n = 12$, 31.6%) and ST14 ($n = 7$, 18.4%) and the 17 other samples (44.8%) to mixed infections. Given the large number of mixed infections identified in animal samples collected in both governorates, only a selection of them was thus re-analysed by non-qPCR to have a partial overview of the STs found in these specimens. Therefore, one sample from each farm presenting mixed infection in North governorate was selected. Cloning of the non-qPCR products was performed from these 9 representative

animal specimens for subtyping, and 5 positive clones were selected arbitrarily and sequenced for each cloning. Seven of the 9 selected samples showed mixed infections with two different STs (ST2/ST1, $n = 4$; ST2/ST10, $n = 1$; ST2/ST14, $n = 2$) whereas the two remaining samples harboured 3 different STs (ST1/ST2/ST10 and ST2/ST10/ST14 respectively). Taking into account these 9 mixed infections consisting of either two or three different STs, the ST distribution in dairy cattle from this governorate was as follows: ST1 ($n = 5$), ST2 ($n = 10$), ST3 ($n = 1$), ST10 ($n = 15$) and ST14 ($n = 10$). The major difference observed between these two animal cohorts in terms of distribution of STs was the presence of only ST2 in the group of North dairy cattle, while it was absent from the Akkar group of animals (Fisher's exact test, 24.4% vs. 0%, $P < 0.05$). By merging all molecular data obtained from dairy cattle samples in North Lebanon region, a total of 125 isolates were subtyped and belonged to 7 different STs with, in order of prevalence, ST10 (55/125, 44.0%), ST14 (46/125, 36.8%), ST2 (10/125, 8.0%), ST1 (9/125, 7.2%), ST5 (3/125, 2.4%), ST3 and ST7 (1/125 each, 0.8%). Herein, ST10 and ST14 were thus largely predominant by accounting for more than 80% of the subtyped isolates. As shown in Table 2 reporting all the isolates subtyped from domestic cattle in various geographical areas, ST10 and ST14 also globally represented the most widely distributed STs (73.2% of total isolates). This was clearly the case, for instance, in Japan (Masuda et al., 2018), Korea (Lee et al., 2018), China (Zhu et al., 2017) and Libya (Alfellani et al., 2013a). Strikingly, ST10 and ST14 were the only two STs identified in cattle in the USA (Santin et al., 2011; Fayer et al., 2012). Therefore, all of these data confirmed that domestic cattle would be natural hosts for *Blastocystis* sp. ST10 and ST14. In addition to these two predominant STs, five minor STs (ST1, ST2, ST3, ST5 and ST7) were identified in the livestock investigated in this study. Briefly, it was the first report of the presence of ST2 and ST7 in domestic cattle, while the three other STs had previously been detected with varying prevalence in the same animal group in different countries (Table 2).

Regarding the breeders cohort, 18 individuals presented single infections by the parasite, and 3 others had mixed infections with two STs. With the addition of these mixed infections, a total of 24 isolates was subtyped. As shown in Table 1, ST3 was predominant (12/24, 50.0%), followed by ST2 (7/24, 29.2%) and ST1 (5/24, 20.8%). In the case of the second human cohort comprising patients enrolled at Hamidi Medical Centre in Tripoli, 20 and 3 of them presented single and mixed infections with two STs respectively. Therefore, a total of 26 isolates was subtyped and three different STs were identified as follows: ST3 (13/26, 50.0%), ST1 (8/26, 30.8%) and ST2 (5/26, 19.2%). Interestingly, no other ST was identified

in these two human groups. Moreover, although the number of samples analysed in each cohort remained limited, the distribution of the different STs was not significantly different between the two human groups (Fisher's exact test, $P = 0.67$). Strikingly, this distribution with predominance of ST3 followed by either ST1 or ST2 was also nearly similar to that observed in previous studies conducted recently among patients at the same hospital in Tripoli, staff members working in poultry slaughterhouses in North Lebanon (Greige et al., 2018) and among schoolchildren in Tripoli (Osman et al., 2016).

By analysing all the molecular data obtained herein, the zoonotic potential of *Blastocystis* sp. was evaluated through the comparison of the ST distribution reported in animal and human cohorts in North Lebanon. Despite the high prevalence of ST10 and ST14 in cattle livestock, neither ST was identified especially in breeders despite these workers having intimate, long-term and repeated contact with these animals. To our knowledge, these two STs have also never been documented in human infections worldwide (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016), suggesting that humans would not be susceptible to their infection. Another hypothesis that remains to be further confirmed could be that these two STs produce non-resistant cystic environmental forms or even produce no cysts, thus preventing any possible transmission of the parasite to another host through indirect contact. ST5 was also infrequently identified in dairy cattle, as in previous studies conducted in various countries (Table 2) and herein only in animals raised at Akkar governorate. Recently, ST5 was proposed as a pig-adapted ST (Wang et al., 2014) and consequently cannot likely be assigned to domestic cattle at this time. Its zoonotic potential was confirmed through the frequent infection of piggery staff by this ST (Wang et al., 2014) and pig-rearing villagers (Yan et al., 2007). However, despite the very large number of samples screened, ST5 has not yet been identified in this study as in other Lebanese human cohorts (Osman et al., 2016; Greige et al., 2018). The only known case of ST7 infection in cattle was identified in this study at a farm located at Akkar governorate. This ST was proposed as an avian-adapted ST with potential zoonotic risk (Alfellani et al., 2013a; Cian et al., 2017) and its episodic prevalence in cattle livestock likely reflected opportunistic infection through contact with bird faeces. Again, ST7 has never been yet identified in the Lebanese human population (Osman et al., 2016; Greige et al., 2018), as confirmed herein. Interestingly, three STs (ST1, ST2 and ST3) were found in common in dairy cattle and their in-contact breeders in North governorate, suggesting potential transmission between the hosts. However, only six animal isolates belonging to these STs and as part of single or mixed infections were identified on 4 different farms at which breeders were infected by the same STs. By comparing the

corresponding dairy cattle and in-contact breeder isolate sequences, 100% identity was shown for only one ST3 isolate infecting both hosts. Since ST3 is known to be predominantly harboured by the human population (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016) including Lebanon and very rarely found in domestic cattle as shown in Table 2, this case of *Blastocystis* sp. ST3 infestation in livestock can likely be explained by reverse zoonosis from human handlers to animals, as suggested in previous studies focused on various animal hosts (Ramirez et al., 2014) and pigs (Wang et al., 2014). Regarding the two others, ST1 and ST2, considered to be emerging STs linked to human infection (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016), their origin in Lebanese domestic cattle remains uncertain according to our sequence data. Globally, the low prevalence of ST1, ST2, ST3, ST5 and ST7 observed in the Lebanese cattle population suggests that these animals are unlikely to be natural hosts of these STs and are potentially opportunistically infected through direct exposure to faecal material from human and non-human hosts or by ingestion of contaminated drinking water or food in their environment, as proposed in both stray and household dogs (Wang et al., 2013; Osman et al., 2015). The difference in the prevalence of ST2 observed between dairy cattle raised in the two Lebanese governorates, while this ST is known to infect humans and numerous animal groups (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016; Cian et al., 2017), reinforced this hypothesis by highlighting different infection sources in two different Lebanese geographical areas. However, since domestic cattle carry potential zoonotic STs, these animals are thus capable of shedding the corresponding isolates and may therefore represent secondary zoonotic reservoirs of infection.

4. Conclusion

This study presents the first molecular epidemiological data on *Blastocystis* sp. infection in cattle livestock in Lebanon. Through both the high number of samples screened and isolates subtyped, it provided new insights into the prevalence and ST distribution of the parasite in this animal host. This survey conducted in North Lebanon demonstrated that dairy cattle were frequently infected by *Blastocystis* sp., with an overall prevalence of the parasite exceeding 60%. This clearly raised the question of the impact of this infection in the bovid sector, which is of major importance in this country. The variety of STs colonising this animal group was also highlighted, with a total of seven STs identified, including ST1, ST2, ST3, ST5, ST7, ST10 and ST14. ST10 and ST14 were largely predominant in this animal population, confirming that both STs could be considered cattle-adapted STs. Others STs were all identified with low prevalence and their presence was suggested to be related to

opportunistic contamination from various animal or even human and environmental sources. Finally, by comparing the ST distribution of the parasite in cattle and in-contact breeders, as well as in individuals without contact with bovids, the risk of zoonotic transmission of *Blastocystis* sp. was demonstrated to be minimal. However, further large-scale studies should be conducted to fully understand the exact role of domestic cattle in the epidemiology of *Blastocystis* sp. and as potential sources of transmission of the parasite to humans, at least as secondary reservoirs.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no competing interests.

Authors' contributions

D.E.S., M.O., G.C., M.H. and E.V. conceived the study and designed the experiments. S.G., D.E.S., S.K., N.G. and M.O. collected the samples and/or performed the experiments. M.B. performed the statistical analyses. S.G., D.E.S., S.K., S.B.V., M.Che, M.Cha, G.C., M.H. and E.V. participated in the interpretation of data. S.G., D.E.S., S.K. and E.V. wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank all those who participated in the study, the staff of Hamidi Medical Centre in Tripoli, breeders for their assistance in sample collection and processing, and veterinary doctor Rabah Outour. This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques of the University of Lille 2, the Partenariat Hubert Curien (PHC) France Lebanon CEDRE 2015 Project n°32684NM from the Ministère des Affaires Etrangères et du Développement International and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur of Lille, the Lebanese University and the Catholic University of Lille. S.G. and S.K. were supported by Ph.D. fellowships from the Azm & Saade Association of Lebanon.

References

- Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., Yoshikawa, H., 2002. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol.* 106, 203-212.
- Ajjampur, S.S., Tan, K.S., 2016. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int.* 65, 772-779.
- Alfellani, M.A., Taner-Mulla, D., Jacob, A.S., Imeede, C.A., Yoshikawa, H., Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2013a. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist.* 164, 497-509.
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E.S., Fagbenro-Beyioku, A.F., Clark, C.G., 2013b. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 126, 11-18.
- Andersen, L.O., Stensvold, C.R., 2016. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *J Clin Microbiol.* 54, 524-528.
- Andersen, L.O., Bonde, I., Nielsen, H.B., Stensvold, C.R., 2015. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol Ecol.* 91, fiv072.
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., Chabé, M., 2016. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep.* 6, 25255.
- Badparva, E., Sadraee, J., Kheirandish, F., 2015. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 8, e14810.
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E.M.S., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C.J.A., van Vugt, M., Goorhuis, A., van Gool, T., 2013. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 13, 389.
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L.L., Monchy, S., Noël, C., Poirier, P., Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Bosc, S., Chabe, M., Petit, T., Certad, G., Viscogliosi, E., 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS One* 12, e0169659.
- Clark, C.G., van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol.* 82, 1-32.

- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., Viscogliosi, E., 2014. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis.* 14, 164.
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A.-P., Botterel, F., Candolfi, E., Desoubeaux, G., Lachaud, L., Morio, F., Pomares, C., Rabodonirina, M., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Gantois, N., Certad, G., Delhaes, L., Poirier, P., Viscogliosi, E., 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis.* 16, 451.
- Fayer, R., Santin, M., Macarasin, D., 2012. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res.* 111, 1349-1355.
- Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H., Evengard, B., 2016. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasit Vectors.* 9, 370.
- Forsell, J., Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Johansson, A., Evengard, B., Granlund, M., 2017. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travelers. *BMC Microbiol.* 17, 231.
- Franco Moura, R.G., de Oliveira-Silva, M.B., Pedrosa, A.L., Nogueira Nascentes, G.A., Cabrine-Santos, M., 2018. Occurrence of *Blastocystis* spp. in domestic animals in Triangulo Mineiro area of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 51, 240-243<;
- Greige, S., El safadi, D., Bécu, N., Gantois, N., Pereira, B., Chabé, M., Benamrouz-Vanneste, S., Certad, G., El Hage, R., Chemaly, M., Hamze, M., Viscogliosi, E., 2018. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasit Vectors.* 11, 389.
- Lee, H., Lee, S.-H., Seo, M.-G., Kim, H.-Y., Kim, J. W., Lee, Y.6R., Kim, J. H., Kwon, O.-D., Kwak, D., 2018. Occurrence and genetic diversity of *Blastocystis* in Korean cattle. *Vet Parasitol.* 258, 70-73.
- Lepczynska, M., Chen, W.C., Dzika, E., 2015. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int J Dermatol.* 55, 259-266.
- Masuda, A., Sumiyoshi, T., Ohtaki, T., Matsumoto, J., 2018. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. *Parasitol Int.* 67, 702-705.

- Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., Viscogliosi, E., 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol.* 43, 348-355.
- Osman, M., Bories, J., El Safadi, D., Poirel, M.-T., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delhaes, L., Hugonnard, M., Certad, G., Zenner, L., Viscogliosi, E., 2015. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol.* 214, 167-170.
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandraine, R., Pinon, A., Lambert, C., Wawrzyniak, I., Dabboussi, F., Delbac, F., Favennec, L., Hamze, M., Viscogliosi, E., Certad, G., 2016. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis.* 10, e0004496.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., Livrelli, V., 2011. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 49, 975–983.
- Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Clavel, A., Causapé, A.C., 1995. Occurrence of *Blastocystis* sp. in cattle in Aragon, northeastern Spain. *Parasitol Res.* 81, 703-705.
- Rajah Salim, H., Suresh Kumar, G., Vellayan, S., Mak, J.W., Khairul Anuar, A., Init, I., Vennila, G.D., Saminathan, R., Ramakrishnan, K., 1999. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res.* 85, 1032-1033.
- Ramirez, J.D., Sanchez, L.V., Bautista, D.C., Corredor, A.F., Florez, A.C., Stensvold, C.R., 2014. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 22, 223-228.
- Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Florez C, Bernal MC, Giraldo JC, Reyes, P., Lopez, M.C., Garcia, L., Cooper, P.J., Vicuna, Y., Mongi, F., Casero, R.D., 2016. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 41, 32-35.

- Santin, M., Gomez-Munos, M.T., Solano-Aguilar, G., Fayer, R., 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res.* 109, 205-212.
- Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2016. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 65, 763-771.
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S., Thompson, R.C., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G., 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol.* 23, 93-96.
- Stensvold, C.R., Alfellani, M.A., Norskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E.L., Maddox, C., Nielsen, H.V., Clark, C.G., 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol.* 39, 473-479.
- 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, K.S.W., Mirza, H., Teo, J.D.W., Wu, B., MacAry, P.A., 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep.* 12, 28-35.
- Udonsom, R., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Pintong, A., Sukthana, Y., Popruk, S., 2018. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infect Genet Evol.* 65, 107-111.
- Wang, W., Cuttell, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Inpankaew, T., Owen, H., Traub, R.J., 2013. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasit Vectors.* 6, 215.
- Wang, W., Owen, H., Traub, R.J., Cuttell, L., Inpankaew, T., Bielefeldt-Ohmann, H., 2014. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet Parasitol.* 203, 264-269.
- Wang, J., Gong, B., Yang, F., Zhang, W., Zheng, Y., Liu, A., 2018. Subtype distribution and genetic characterization of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infect Genet Evol.* 57, 171-176.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Meloni, D., Texier, C., Delbac, F., El Alaoui, H., 2013. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.* 1, 167-178.

- Yan, Y., Su, S., Ye, J., Lai, X., Lai, R., Liao, H., Chen, G., Zhang, R., Hou, Z., Luo, X., 2007. *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol Res.* 101, 1527-1532.
- Yoshikawa, H., Koyama, Y., Tsuchiya, E., Takami, K., 2016. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol Int.* 65, 750-759.
- Zhu, W., Tao, W., Gong, B., Yang, H., Li, Y., Song, M., Lu, Y., Li, W., 2017. First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. *Vet Parasitol.* 246, 38-42.

Table 1

Prevalence of *Blastocystis* sp. infection and ST distribution in animal and human cohorts in North Lebanon

Infection	Akkar dairy cattle (n = 157)	North dairy cattle (n = 97)	North breeders (n = 40)	North hospital patients ^a (n = 40)
% positive	78.3% (123)	39.2% (38 ^b)	52.5% (21 ^c)	57.5% (23 ^d)
ST1	4	5	5	8
ST2	0	10	7	5
ST3	0	1	12	13
ST5	3	0	0	0
ST7	1	0	0	0
ST10	40	15	0	0
ST14	36	10	0	0
MI ^e	39	8	0	0

^aHamidi Medical Centre, Tripoli

^bMixed infections by 2 or 3 STs identified in 9 selected samples resulting in the molecular characterisation of a total of 40 isolates

^cMixed infections by 2 STs identified in 3 samples resulting in the molecular characterisation of a total of 24 isolates

^dMixed infections by 2 STs identified in 3 samples resulting in the molecular characterisation of a total of 26 isolates

^eMI, Mixed infections with unidentified STs

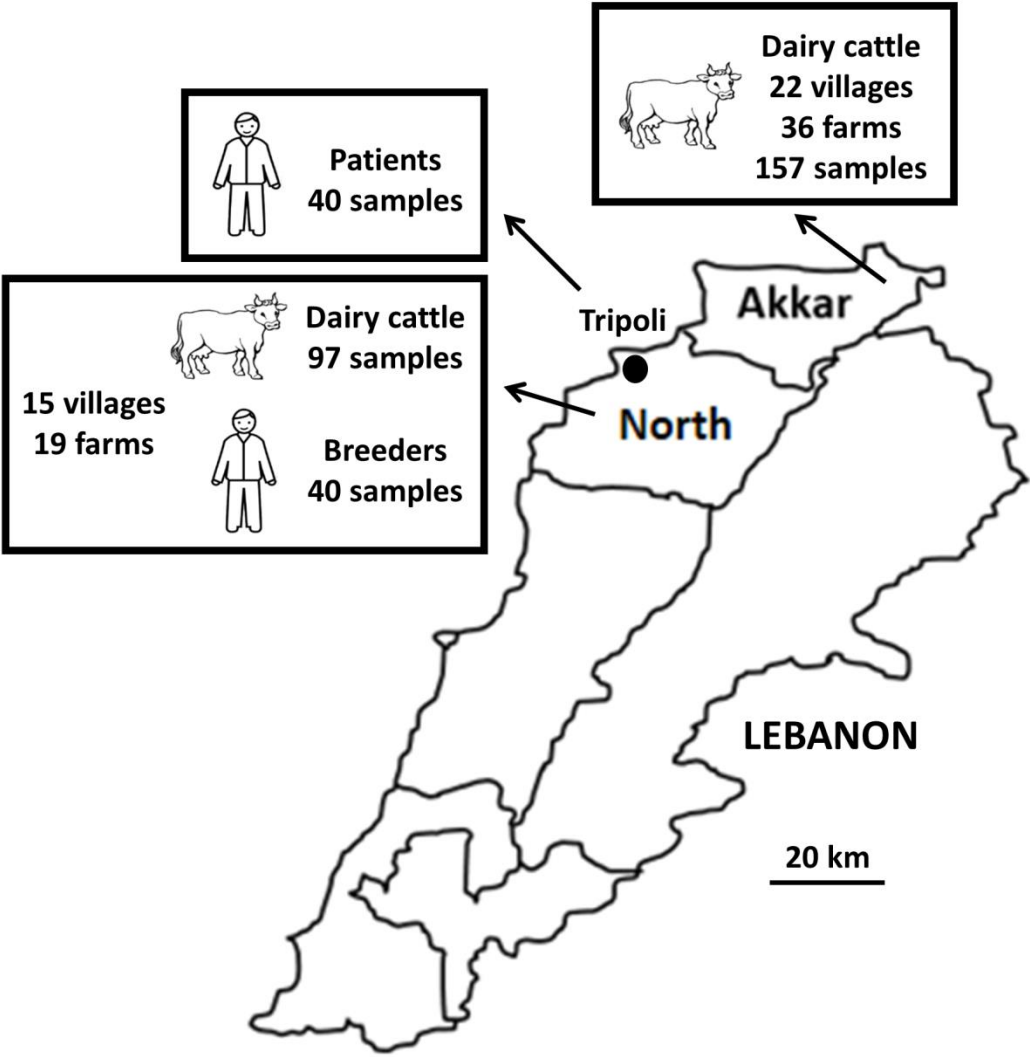
Table 2ST distribution of *Blastocystis* sp. in domestic cattle around the world

Country	No. of isolates identified by sequencing	<i>Blastocystis</i> sp. STs										Reference
		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST10	ST12	ST14	
Japan	45	0	0	0	0	0	0	0	1	0	44	Masuda et al., 2018
Japan^a	8	1	0	1	0	6	0	0	0	0	0	Yoshikawa et al., 2004
Japan^a	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	Abe et al., 2003
Korea	30	6	0	0	0	5	0	0	9	0	10	Lee et al., 2018
China	14	0	0	2	0	0	0	0	10	0	2	Wang et al., 2018
China	54	0	0	0	2	1	0	0	41	0	10	Zhu et al., 2017
Thailand	6	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	Udonsom et al., 2018
Iran^a	17	0	0	4	0	11	2	0	0	0	0	Badparva et al., 2015
Libya	10	0	0	0	0	2	0	0	6	0	2	Alfellani et al., 2013a
Lebanon	125	9	10	1	0	3	0	1	55	0	46	Present study
UK	5	1	0	0	0	1	0	0	3	0	0	Alfellani et al., 2013a
Colombia	20	12	0	8	0	0	0	0	0	0	0	Ramirez et al., 2014
USA	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	Santin et al., 2011
USA	11	0	0	0	0	0	0	0	8	0	3	Fayer et al., 2012
Total	355	30	10	18	2	29	2	1	142	4	117	

^aPCR using ST-specific primers allowing the detection of only ST1 to ST7

Figure captions

Fig. 1. Study area in Lebanon and description of the animal and human cohorts screened in this epidemiological survey.



3. Epidémiologie moléculaire de *Blastocystis* sp. chez les réfugiés syriens du Nord Liban

Cette étude fait l'objet d'un article publié dans la revue « Microorganisms».

***Blastocystis* sp. prevalence and subtypes distribution amongst Syrian refugee communities living in North Lebanon**

Salma Khaled, Nausicaa Gantois, Aisha Ayoubi, Gaël Even, Manasi Sawant, Jinane El Houmayraa, Mathieu Nabot, Sadia Benamrouz-Vanneste, Magali Chabé, Gabriela Certad, Dima El Safadi, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze and Eric Viscogliosi
Microorganisms 2021, 9, 184

a. Contribution de la candidate à l'étude

- Collecte des échantillons humains sur le terrain et des données cliniques des participants à l'étude
- Management et organisation de la collection d'échantillons
- Réalisation des expériences de biologie moléculaire et analyse des séquences
- Interprétation des données obtenues
- Rédaction de l'article

b. Résumé de l'étude

Malgré un nombre croissant d'enquêtes épidémiologiques visant à clarifier la prévalence et la diversité génétique des isolats de *Blastocystis* sp. à travers le monde, plusieurs régions géographiques restent encore mal explorées, comme le Moyen-Orient et les pays de la péninsule arabique. En particulier, aucune étude épidémiologique n'a jamais été réalisée dans la population syrienne. Cela peut en grande partie s'expliquer par la crise syrienne qui dure depuis 2011 et qui empêche toute enquête sur le terrain. Par conséquent, notre premier objectif a été de combler une lacune géographique dans notre connaissance de la prévalence et de la diversité de *Blastocystis* sp. en menant une étude à grande échelle chez les réfugiés syriens hébergés dans des camps dans la région du Nord-Liban. De plus, le rôle des migrants dans les épidémies de maladies parasitaires dans les pays d'accueil a déjà été bien documenté. Comme les données moléculaires concernant l'épidémiologie moléculaire de

Blastocystis sp. étaient déjà disponibles pour la population libanaise vivant dans cette même région du Nord-Liban, notre second objectif a donc été de comparer les STs et génotypes identifiés dans les populations syrienne et libanaise afin d'évaluer le niveau de circulation du parasite entre ces deux communautés.

Un total de 306 échantillons de selles de réfugiés syriens a donc été collecté. Ces réfugiés présentaient ou non des symptômes digestifs et étaient hébergés dans 26 camps avec ou sans assainissement localisés au Nord-Liban. La détection de *Blastocystis* sp. et le sous-typage des isolats pour les échantillons positifs a été réalisé comme pour les deux études précédentes. La prévalence globale du parasite atteignait 63,7% dans cette cohorte de réfugiés. A partir du questionnaire rempli par chaque participant de cette étude, nous avons pu montrer que la colonisation par *Blastocystis* sp. n'était pas associée de manière significative au sexe, à l'âge ou à l'état symptomatique des participants ni à la présence de douleurs abdominales ou de diarrhée chez ces derniers. En revanche, l'état sanitaire des camps a été identifié comme un facteur de risque d'infection. Sans surprise, la prévalence du parasite était nettement plus élevée dans les camps dépourvus d'assainissement.

Parmi les 195 échantillons de selles positifs pour *Blastocystis* sp., 15,9 % d'entre eux représentaient des infections mixtes. Dans l'analyse des 164 isolats positifs restants correspondant à des infections simples, ST3 était le ST le plus souvent détecté (54,3%), suivi du ST1 (26,2%), du ST2 (18,9%) et du ST10 (0,6%). Cette distribution était donc très similaire à celles observées pour les autres pays du Moyen-Orient dont le Liban. De plus, ce type de distribution avec une très forte prédominance des ST1 à ST3 suggérait fortement une large transmission interhumaine. Pour ce qui est de l'isolat de ST10 identifié chez les réfugiés et comme discuté dans notre étude précédente menée au Sénégal, il était, sans doute possible, d'origine zoonotique. D'autre part, on notait que comme au Liban, le ST4 était inexistant dans la population syrienne. En outre, la distribution des STs de *Blastocystis* sp. était similaire entre les camps avec ou sans assainissement et aucune association significative n'a été démontrée entre les STs et le sexe ou l'âge des participants. Il est intéressant de noter qu'aucun ST particulier n'était associé au statut symptomatique des réfugiés ou à des troubles digestifs tels que des douleurs abdominales ou des diarrhées.

L'étape suivante de notre enquête a consisté à étudier la diversité intra-ST des trois principaux STs (ST1 à ST3) signalés dans la cohorte de réfugiés syriens par l'identification de génotypes. Le ST3 présentait la plus faible diversité intra-ST suivi du ST2 et du ST1. Il était frappant de constater que la même approche avait montré, dans notre enquête précédente, un ordre similaire dans la diversité intra-ST des ST1 à ST3 parmi les isolats sénégalais. Au sein

de la cohorte syrienne, la transmission interhumaine était donc largement prédominante, expliquant le faible nombre de génotypes trouvés dans cette population.

L'analyse comparative des génotypes de *Blastocystis* sp. caractérisés chez les réfugiés syriens et de ceux circulant dans la population libanaise locale du Nord Liban montrait que seuls 16,6% des 277 isolats libanais appartenant aux ST1 à ST3 pouvait être classés parmi les 12 génotypes syriens identifiés. En outre, certains génotypes syriens n'avaient pas été identifiés dans la population libanaise. Sur cette base, nous avons pu suggérer que la circulation du parasite entre la population locale et les réfugiés était très limitée en raison de contacts restreints entre ces deux communautés.

***Blastocystis* sp. prevalence and subtypes distribution amongst Syrian refugee communities living in North Lebanon**

Salma Khaled ^{1,2}, Nausicaa Gantois ¹, Aisha Ayoubi ², Gaël Even ^{3,4}, Manasi Sawant ¹, Jinane El Houmayraa ⁵, Mathieu Nabot ⁶, Sadia Benamrouz-Vanneste ^{1,7}, Magali Chabé ¹, Gabriela Certad ^{1,8}, Dima El Safadi ², Fouad Dabboussi ², Monzer Hamze ² and Eric Viscogliosi ^{1,*}

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 9017 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, F-59000 Lille, France

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

³ Gènes Diffusion, F-59501 Douai, France

⁴ PEGASE-Biosciences (Plateforme d’Expertises Génomiques Appliquées aux Sciences Expérimentales), Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

⁵ Concern Worldwide, HDYS Building (Opposite Abdel Karim Rifai Petrol Station), Halba, Akkar, Lebanon

⁶ Solidarités International, Ras Al Naba’a, Chaar street, Chaar building, Beirut, Lebanon

⁷ Laboratoire Ecologie et Biodiversité, Faculté de Gestion Economie et Sciences, Institut Catholique de Lille, F-59000 Lille, France

⁸ Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation, Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille, F-59462 Lomme, France

* Correspondence: eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

Abstract:

Molecular data concerning the prevalence and subtype (ST) distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. remain scarce in the Middle East. Accordingly, we performed the first molecular epidemiological survey ever conducted in the Syrian population. A total of 306 stool samples were collected from Syrian refugees living in 26 Informal Tented Settlements (ITS) subjected or not to Water, Sanitation and Hygiene (WASH) interventions in North Lebanon, then screened for the presence of *Blastocystis* sp. by real-time polymerase chain reaction followed by subtyping. The overall prevalence of the parasite was shown to reach 63.7%. *Blastocystis* sp. colonization was not significantly associated with gender, age, symptomatic status, abdominal pain or diarrhea. In contrast, WASH intervention status of ITS was identified as a risk factor for infection. Among a total of 164 subtyped isolates, ST3 was predominant, followed by ST1, ST2 and ST10. No particular ST was reported to be associated with age, gender, symptomatic status, digestive disorders or WASH intervention status of ITS. Intra-ST diversity of ST1 to ST3 was low suggesting large-scale anthroponotic transmission. Moreover, comparative analysis of ST1 to ST3 genotypes revealed that the circulation of the parasite between Syrian refugees and the host population was likely limited.

Keywords: *Blastocystis* sp.; intestinal parasites; Syrian refugees; North Lebanon; internal tented settlements; molecular epidemiology; real-time PCR; SSU rDNA subtyping; transmission; risk factors

1. Introduction

Blastocystis sp. is currently the most frequent intestinal protozoa found in the human gut [1-4]. Indeed, by extrapolating published prevalence data from many countries, *Blastocystis* sp. is estimated to colonize between 1 and 2 billion people on a global scale [5]. This high prevalence of the parasite all over the world is strongly related to its main mode of transmission, which is the fecal-oral route mainly through the consumption of contaminated water [6,7]. The transmission of *Blastocystis* sp. is thus naturally favored by the precarious sanitary and hygienic conditions encountered in certain populations with low level of sanitation, particularly in African, Asian or American developing countries [8-13]. On the other hand, the zoonotic potential of *Blastocystis* sp. has been confirmed in recent epidemiological surveys and several animal groups colonized by the parasite such as birds and pigs may represent additional reservoirs of infection for human beings [14-16], thus potentially contributing to a prevalence increase.

Consequently, the ubiquity and high prevalence of the parasite has a major impact on public health even though a large number of individuals colonized by the parasite do not present digestive symptoms (i.e. asymptomatic patients) [7,17-19]. However, asymptomatic carriage and high prevalence in healthy individuals does not preclude pathogenicity. Indeed, numerous clinical cases of blastocystosis reported patients presenting nonspecific gastrointestinal disorders including diarrhea and abdominal pain, without any other causal organisms [20,21]. It is therefore clear that under certain conditions related for instance to the microbiota composition and immunocompetent status of the host and/or to the variable virulence of the parasite isolates, colonization by *Blastocystis* sp. becomes an infection. In this regard, virulence factors and mechanisms associated with the pathogenicity of the parasite have been identified mainly through the accumulating data of *in vitro* and comparative genomics studies [22,23].

Even if it remains challenging to differentiate one *Blastocystis* sp. isolate from another based on morphological criteria [1,2,7], this genus is highly genetically divergent since 17 different subtypes (STs) (arguably species) have been validated so far in mammals and birds through the comparison of small subunit (SSU) rDNA gene sequences [24-26]. This genetic diversity also extends to *Blastocystis* sp. isolates identified in amphibians, reptiles, fish and insects, in which potential additional STs were described [14,27-30]. By synthesizing all available epidemiological data, *Blastocystis* sp. ST1 to ST4 represent the most frequent STs identified in the human population worldwide and account for around 95% of all human carriage [9,18,31-33], consistent with a large-scale anthroponotic transmission of the parasite.

The 8 other STs found in the human population with a lower frequency (ST5-ST10, ST12 and ST14) [9,14,32,34] were supposed to be of zoonotic origin. This was strongly evidenced through the unusual high prevalence of ST8 in zoo monkey keepers [34], ST5 in piggery workers [15] and ST6 in poultry slaughterhouse staff [16], likely correlated with repeated exposure to animals.

Despite an increasing number of epidemiological surveys conducted in the last decade to clarify the molecular distribution and genetic diversity of *Blastocystis* sp. isolates around the globe, several geographical regions remain yet poorly explored such as the Middle East and Arabian Gulf countries. Indeed, data currently available mainly focuses on Lebanon [4,16,35,36], Iran [37,38] and Saudi Arabia [39]. To our knowledge, no molecular epidemiological study has ever been performed in the Syrian population, in part because of the humanitarian crisis that has heavily impacted this country since 2011. This crisis has furthermore displaced a huge number of refugees into Lebanon increasing the total host population by 30% [40]. Most Syrian refugees are at risks for contracting parasitic infections as they face extreme high rates of poverty without proper access to infrastructure services and adequate sewage systems. This may obviously create the perfect environment for wide dissemination and outbreaks of parasitic infections among Syrians and Lebanese population as well.

Therefore, our first aim was to fill a geographical gap in the knowledge of *Blastocystis* sp. prevalence and diversity by conducting a large-scale epidemiological survey in Syrian refugees living in informal tented settlements (ITS) in North Lebanon and to assess the burden of the parasite in this at-risk population. In addition, since molecular data regarding *Blastocystis* sp. epidemiology were already available from previous studies conducted in the Lebanese population living in the North Lebanon region, our second aim was thus to compare the STs and genotypes identified in the Syrian and local populations to investigate the circulation/transmission of the parasite between both communities.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics approval

Ethical approval for this project was obtained from the local competent Ethics Committee of AZM Center for Research in Biotechnology and its Applications, Tripoli, Lebanon (Reference number CE-EDST-7-2018; Date of approval: 12/14/2018). This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki III) and with the International Ethical Guidelines for Biological

Research Involving Human Subjects. After a clear explanation of the research objectives prior to enrolment, written informed consents were obtained from each adult or from the parents or legal guardians of each children included in this study.

2.2. Questionnaire survey

A standardized questionnaire was designed to collect information about each participating Syrian refugee including gender, age and city of origin as well as clinical data regarding the presence of any digestive symptoms (diarrhea, abdominal pain, vomiting, bloating and constipation). A participant was considered symptomatic if at least one of the five selected digestive disorders described above was present. All data collected from each subject remained confidential and were fully anonymized through the encryption of the identity of individuals.

2.3. Sites sampling and collection of samples

This large-scale study was conducted in 26 Informal Tented Settlements (ITS) inhabited by Syrian refugees and located in the vicinity of the city of Halba (latitude 34°33'2"N, longitude 36°4'41"E), the capital of the Akkar governorate in North Lebanon region (Figure 1). The nomenclature of the ITS was also encrypted in the present report.

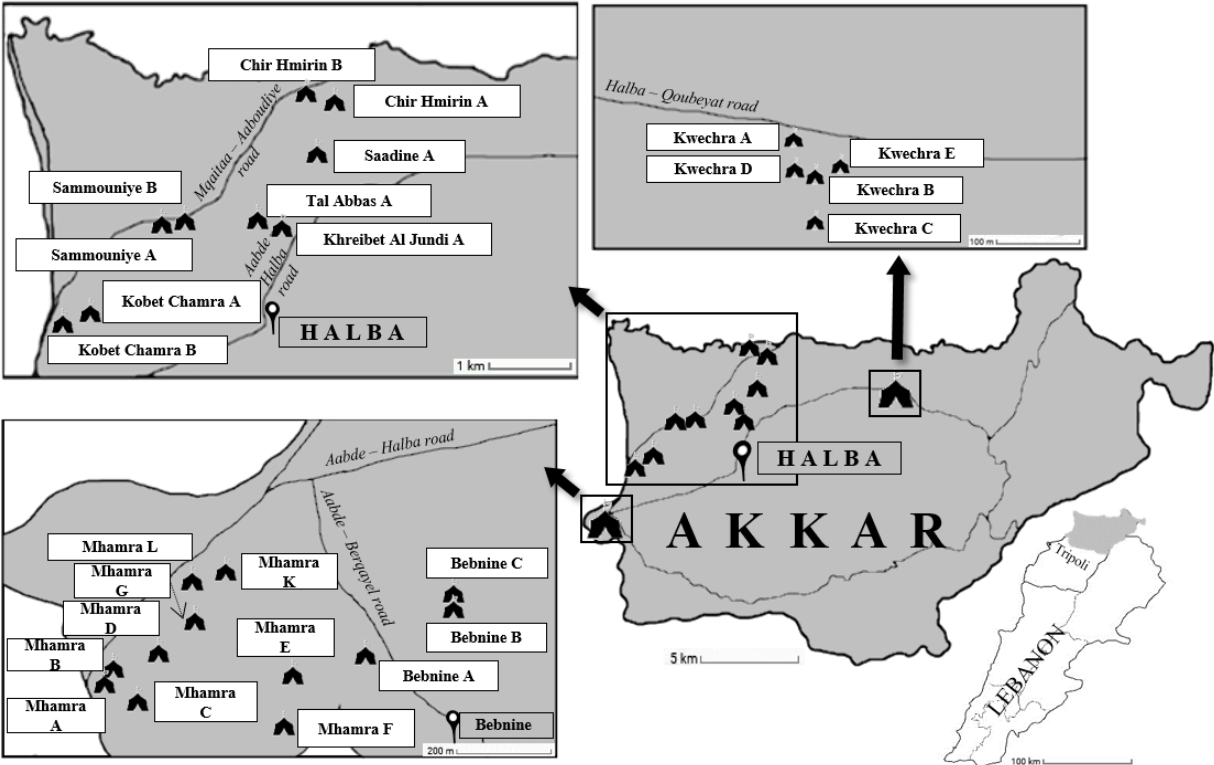


Figure 1. Location of the 26 ITS in the governorate of Akkar in the North Lebanon region screened for the presence of *Blastocystis* sp.

Halba is situated about ten kilometers from the Syrian border. The refugees participating in this survey originate from several major Syrian cities such as Aleppo, Racca, Homs, Hama, Qamishli and Deir ez-Zor. The distribution of the refugees in the ITS is mainly organized by region of origin and a large proportion of them are housed in these ITS since the beginning of the Syrian crisis in 2011. As shown in Table 1, 184 stool samples were collected in 16 ITS so-called ITS with Water, Sanitation and Hygiene (WASH) intervention (WI), in which drinking water supply, rehabilitation/construction of toilets, regular waste removal and hygiene promotion awareness were provided by the two non-governmental organizations (NGOs) Concern Worldwide and Solidarités International. The remaining 122 stool samples were collected in 10 other ITS so called ITS without WI where no facilities were yet provided by NGOs at the time of sampling regarding sanitation and hygiene conditions. For drinking, washing, and domestic activities, refugees in ITS without WI could use wells close to the camps. In the absence of wells, NGOs provide only drinking water through safe water trucking.

Table 1. Prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in the ITS housed by Syrian refugees screened in the present study

ITS ^a	Samples (n)	Positive samples (n)	Prevalence (%)	<i>Blastocystis</i> sp. STs				
				ST1	ST2	ST3	ST10	MI ^b
With WI^c								
Kwechra A	1	0	0	0	0	0	0	0
Kwechra B	6	6	100	2	1	2	0	1
Kwechra C	7	4	57.1	0	0	2	0	2
Kwechra D	13	12	92.3	4	2	4	0	2
Kwechra E	7	5	71.4	1	0	4	0	0
Mhamra A	16	8	50	2	0	6	0	0
Mhamra B	21	15	71.4	3	0	11	0	1
Mhamra C	39	21	53.8	2	8	5	0	6
Mhamra D	14	7	50	2	3	1	0	1
Mhamra E	17	10	58.8	1	0	7	0	2
Chir Hmirin A	3	3	100	2	0	1	0	0
Chir Hmirin B	2	2	100	0	0	2	0	0
Khraybet Al Jundi A	16	9	56.3	1	3	3	0	2
Sammouniye A	3	2	66.7	0	0	1	0	1
Saadine A	17	5	29.4	0	2	3	0	0
Tal Abbas A	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	184	109	59.2	20	19	52	0	18
Without WI								

Bebnine A	8	4	50	2	0	1	0	1
Bebnine B	10	5	50	2	1	2	0	0
Bebnine C	1	0	0	0	0	0	0	0
Mhamra F	4	4	100	1	2	0	0	1
Mhamra G	6	4	66.7	0	1	2	1	0
Mhamra K	2	2	100	0	0	2	0	0
Mhamra L	6	5	83.3	2	1	2	0	0
Kobet Chamra A	16	11	68.8	4	1	6	0	0
Kobet Chamra B	58	43	74.1	9	3	20	0	11
Sammouniye B	11	8	72.7	3	3	2	0	0
Total	122	86	70.5	23	12	37	1	13
Grand total	306	195	63.7	43	31	89	1	31

^a ITS, Informal Tented Settlements; ^b MI, Mixed infections; ^c WI, WASH Intervention

With the valuable assistance of NGOs staff, the fecal sample collection was conducted between February and December 2019. Briefly, 1 to 58 stool samples were collected in each of the 26 ITS (Table 1), for an overall total of 306 samples. The highly variable number of collected samples between ITS was correlated to the size of the settlements and the number of volunteers for this study in each sampling site. For each subject, one fresh stool sample was collected in a sterile container then immediately transported to the Laboratory Microbiologie Santé et Environnement, Doctoral School of Sciences and Technologie in Tripoli for DNA extraction.

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

Total genomic DNA was extracted from approximately 250 mg of stool samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended procedures then eluted in 200 µl of elution buffer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). All DNA samples were stored at -20°C then transported to the Institut Pasteur of Lille (France). To detect and subtype *Blastocystis* sp., 2 µl of extracted DNA from each sample was subjected to highly sensitive real-time PCR (qPCR) assay using the *Blastocystis*-specific primers BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3') and BL18SR2PP (5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3') targeting the small subunit (SSU) rDNA gene as previously described [41]. The corresponding amplified gene domain of about 300 bp has been shown to contain sufficient sequence information for accurate subtyping of *Blastocystis* sp. isolates. Positive (DNA from *Blastocystis* sp. ST7 axenic culture) and negative (DNA replaced by water) qPCR controls were included with each batch of samples analyzed. The qPCR product from each positive sample was purified and directly sequenced on both strands (Genoscreen, Lille, France). For a proportion of samples, sequence

chromatograms analysis revealed the presence of double traces, suggesting mixed infections by at least two different *Blastocystis* STs that were not determined. The SSU rDNA sequences obtained in this study from samples presenting single infection were deposited in GenBank under accession numbers MW168447 to MW168610. Obtained sequences were compared with all *Blastocystis* sp. homologous sequences of known STs available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known *Blastocystis* sp. STs [14,26]. Moreover, the sequences of *Blastocystis* sp. isolates belonging to the same ST (ST1, ST2 or ST3) were aligned with each other using the BioEdit v7.0.1 package (Date of release 06/10/2019; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) to determine intra-ST diversity and identify so-called genotypes referring to genetically distinct strains within the same ST as described in recent surveys [9,16]. Subsequently, ST1, ST2 and ST3 sequences from isolates previously identified in the local population of North Lebanon [4,16,35,36] were extracted from databases and compared to genotypes reported herein from the cohort of Syrian refugees.

2.5. Statistical analysis

For the statistical analysis, Fisher's exact test was used to test the relationship between different categorical variables. Multilevel logistic mixed regression models were also used to calculate odds ratios (OR) and 95% confidence interval (CI) and to measure the association of the explanatory variables considering *Blastocystis* sp. colonization, STs and genotypes as the main outcomes. The general significance level was set at a *p*-value below 0.05. All analyses were performed using packages stats and odds ratio from the R statistical computing program v. 3.6.1 (Date of release 07/05/2019) (R Development Core Team; <http://www.R-project.org>).

3. Results

3.1. Analysis of the cohort of Syrian refugees and prevalence of *Blastocystis* sp.

Stool samples were collected from a total of 306 Syrian refugees housed in 26 ITS located in North Lebanon. The sex ratio (F/M) was 1.47 and the age of the participants was between 1 and 85 years (mean age of 20.4 ± 16.7 years). Epidemiological records revealed that 131/306 refugees (42.8%) suffered from digestive symptoms. Among this cohort, 74 individuals (56.5%) presented abdominal pain, 47 (35.9%) diarrhea, 36 (27.5%) constipation, 32 (24.4%) bloating and 7 (5.3%) vomiting. Moreover, 84 of the 131 symptomatic individuals

reported only one of these digestive symptoms, while 31 and 16 exhibited two or three of these selected intestinal disorders, respectively. The remaining 175 participants were considered asymptomatic at the time of the survey. The number of asymptomatic individuals was statistically significantly higher than the number of symptomatic individuals in the age groups 0-14 years (101 asymptomatic versus 56 symptomatic; OR: 0.547, CI: 0.345-0.863, $p = 0.001$) but not in the 15-29 years age group (35 versus 29; OR: 1.137, CI: 0.65-1.978, $p = 0.6$). In contrast, the prevalence of symptomatic participants was reported to be significantly higher in the group aged over 30 years (46 versus 39; OR: 1.887, CI: 1.14-3.14, $p = 0.01$).

3.2. Screening for *Blastocystis* sp. using qPCR

Of the 306 stool samples tested for the presence of *Blastocystis* sp. by qPCR, 195 of them were positive for the parasite leading to an overall prevalence of 63.7% (Table 1). Analysis of our data based on qPCR detection revealed that neither sex (62.9% of males versus 64.3% of infected females; OR: 1.062, CI: 0.659-1.704, $p = 0.80$) nor age (Fisher exact test, $p = 0.1$) of the participants affected prevalence significantly. However, subgroup analysis showed the highest prevalence of *Blastocystis* sp. in the group of refugees aged over 30 years (60/85, 70.6%), followed by the group aged 0-14 years (101/157, 64.3%) and subjects aged 15-29 years (34/64, 53.1%). The average prevalence of the parasite in refugees housed in ITS without WI (86/122, 70.5%) was significantly higher than that observed among refugees living in ITS with WI (109/184, 59.2%) (OR: 1.644, CI: 1.014-2.695, $p = 0.04$). Regarding *Blastocystis* sp. infection and digestive symptoms, the prevalence of the parasite was not significantly higher in symptomatic refugees (84/131, 64.1%) than in asymptomatic carriers (111/175, 63.4%) (OR: 1.03, CI: 0.644-1.655, $p = 0.9$). Within the group of participants positive for *Blastocystis* sp., abdominal pain was reported in 27.2% (53/195) of the subjects, followed by diarrhea (17.4%, 34/195), constipation (9.2%, 18/195), bloating (8.7%, 17/195) and vomiting (1.5%, 3/195). Even if abdominal pain and diarrhea were more frequent in this cohort compared to non-carriers (27.2% versus 18.9% and 17.4% versus 11.7%, respectively), no significant difference was identified in the frequency of these symptoms between these two groups of participants (OR: 1.6, CI: 0.915-2.876, $p = 0.11$ for abdominal pain and OR: 1.592, CI: 0.818-3.265, $p = 0.18$ for diarrhea).

3.3. Distribution of *Blastocystis* sp. STs and genotypes

The qPCR products of the 195 samples positive for *Blastocystis* sp. in the present study were all sequenced on both strands. For 31 of these samples (15.9%), sequence

chromatograms with multiple signals were obtained, suggesting mixed infections by different STs. The remaining 164 isolates corresponded to single infections by one ST, exhibiting 100% sequence identity with the reference sequences of known STs as for instance isolate 26 sequence for ST1 (GenBank accession number MT645808), isolate 515 sequence for ST2 (MN836830), isolate 31 sequence for ST3 (MT645813) and isolate HC104 for ST10 (MF573945). The most frequent ST identified in the entire cohort of Syrian refugees was ST3 (54.3%; 89/164), followed by ST1 (26.2%; 43/164), ST2 (18.9%; 31/164) and ST10 (0.6%; 1/164). This ST distribution was not significantly associated with gender (Fisher exact test, $p = 0.29$) or age (Fisher exact test, $p = 0.19$) of the refugees. No significant difference in the distribution of STs was reported between ITS with or without WI because ST1 (OR: 1.651, CI: 0.836-3.186; $p = 0.15$), ST2 (OR: 0.789, CI: 0.351-1.716, $p = 0.56$) and ST3 (OR: 0.863, CI: 0.486-1.528, $p = 0.61$) were not more frequently found in either of these two types of ITS. No significant association was detected between ST1 (OR: 0.505, CI: 0.237-1.028, $p = 0.07$), ST2 (OR: 1.082, CI: 0.494-2.342, $p = 0.84$) or ST3 (OR: 1.705, CI: 0.962-3.041, $p = 0.07$) and the symptomatic status of the refugees. Abdominal pain and diarrhea were also not shown to be significantly associated with ST (Fisher exact tests, $p = 0.45$ and $p = 0.76$, respectively).

To evaluate intra-ST diversity and identify genotypes, the partial SSU rDNA gene sequences obtained in the present survey and belonging to ST1, ST2 or ST3 were aligned with each other. As shown in Figure 2, the comparison of the 43 ST1, 31 ST2 and 89 ST3 sequences revealed 5, 2 and 3 variable positions, respectively, i.e. positions showing at least one nucleotide difference within at least one of the compared sequences. This comparison allowed the identification of 5 ST1 (ST1-1 to ST1-5), 3 ST2 (ST2-1 to ST2-3) and 4 ST3 (ST3-1 to ST3-4) genotypes among the Syrian population.

A	B	C
	12	12
33333	42	832
01234	13	731
ST1-1 ATCAA (18/43) (41.9%)	ST2-1 GT (12/31) (38.7%)	ST3-1 AAT (79/89) (88.8%)
ST1-2 .GTT. (1/43) (2.3%)	ST2-2 .A (17/31) (54.8%)	ST3-2 ..A (4/89) (4.5%)
ST1-3 ..ACT (9/43) (21.0%)	ST2-3 AA (2/31) (6.5%)	ST3-3 ..C (2/89) (2.2%)
ST1-4 G.ACT (2/43) (4.6%)		ST3-4 TG. (4/89) (4.5%)
ST1-5 TGTT. (13/43) (30.2%)		

Figure 2. Alignment of partial SSU rDNA gene sequences from *Blastocystis* sp. ST1 (A), ST2 (B), and ST3 (C) isolates colonizing Syrian refugees. Positions of variable nucleotides in comparison to reference sequences (genotypes ST1-1, ST2-1 and ST3-1) are indicated above

the alignment (vertical numbering). Genotypes identified within each ST are indicated on the left of the alignments. Nucleotides identical to those of the reference sequences are represented by dashes. On the right of each alignment are reported the total number and percentage of isolates identified in Syrian refugees for each genotype.

The ratio between the number of isolates and genotypes belonging to ST1, ST2 and ST3 was 8.6 (43/5), 10.3 (31/3) and 22.3 (89/4), respectively. The major ST1 (ST1-1, ST1-3 and ST1-5), ST2 (ST2-1 and ST2-3) and ST3 (ST3-1) genotypes included all together more than 90% of the total number of isolates characterized in this study. The remaining 2 ST1, 1 ST2 and 3 ST3 genotypes were only represented by 1 to 4 isolates. The distribution of genotypes was not significantly different according to age (Fisher exact test, $p = 0.30$), WI status of ITS (Fisher exact test, $p = 0.39$), symptomatic status of the refugees (Fisher exact test, $p = 0.21$) or digestive disorders exhibited by Syrian participants such as abdominal pain (Fisher exact test, $p = 0.58$) and diarrhea (Fisher exact test, $p = 0.76$). In contrast, distribution of genotypes was reported to be slightly significantly associated with sex of the refugees (Fisher exact test, $p = 0.05$). Accordingly, genotype ST3-1 which largely predominated in refugees was less frequently identified in males than in females (OR: 0.513, CI: 0.267-0.971, $p = 0.04$). Moreover, although the number of isolates belonging to genotype 1-5 was limited, this genotype was more frequent in males than in females (OR: 3.958, CI: 1.227-15.172, $p = 0.03$)

To clarify the circulation of *Blastocystis* sp. between refugees and the host population, the 277 sequences of isolates previously identified in Lebanese individuals living in the region of North Lebanon and belonging to ST1 (68 isolates), ST2 (74 isolates) and ST3 (135) (Table 2) were extracted from databases and aligned with those obtained in the present study.

Table 2. Distribution and percentages of ST1, ST2 and ST3 isolates among the Lebanese population living in North Lebanon region and the Syrian refugee cohort.

Cohort	<i>Blastocystis</i> sp. STs			Reference
	ST1	ST2	ST3	
Lebanon	12 (34.3%)	12 (34.3%)	11 (31.4%)	[35]
Lebanon	35 (25.4%)	39 (28.2%)	64 (46.4%)	[4]
Lebanon	8 (14.8%)	11 (20.4%)	35 (64.8%)	[16]
Lebanon	13 (26.0%)	12 (24.0%)	25 (50.0%)	[36]
Total Lebanon	68 (24.5%)	74 (26.7%)	135 (48.8%)	
Syrian refugees	43 (26.4%)	31 (19.0%)	89 (54.6%)	Present study

Briefly, among the 68 Lebanese ST1 isolates, 22 of them (32.4%) showed identical sequences with Syrian ST1-1 (10), ST1-2 (2), ST1-3 (5) or ST1-5 (5) genotypes. Syrian genotype ST1-4 was not found in the Lebanese population. Regarding the 74 Lebanese ST2 isolates, 19 of them (25.7%) exhibited 100% sequence identity with Syrian ST2-1 (12), ST2-2 (6) or ST2-3 (1) genotype. Strikingly, only 3.7% of the Lebanese ST3 isolates (5/135) belonged to ST3-2 (1) and ST3-3 (4) Syrian genotypes. The predominant Syrian genotype ST3-1 together with ST3-4 was not identified in the Lebanese population.

4. Discussion

To our knowledge, this study is the first to explore the prevalence and distribution of *Blastocystis* sp. STs and genotypes in the Syrian population. This allowed us to broaden our knowledge about the epidemiology of *Blastocystis* sp. in a region of the world still poorly investigated, such as the Middle East, wherein some populations living in this geographical area may be considered at risk of infection due to precarious sanitary conditions and deficient drinking water supply. Because of the Syrian crisis, conducting field studies in Syria remains almost impossible which may partly explain the crucial lack of current molecular epidemiological data and burden assessment regarding intestinal parasitic protozoa. Consequently, this large-scale survey was conducted in the ITS housing Syrian refugees in the North Lebanon region.

Through the screening of stool samples collected from 306 Syrian refugees of which about 43% suffering from digestive symptoms, qPCR assay revealed an overall prevalence of *Blastocystis* sp. reaching 63.7%, highlighting a wide circulation of the parasite in this community. Such high frequency corresponded well with prevalence data obtained previously using molecular tools in Middle Eastern countries such as Lebanon (55 to 63% depending of the cohort) [4,16,36] but was much more substantial than those observed in Saudi Arabia (10.5%) [39] and Iran (6.5%) [42]. Prevalence of *Blastocystis* sp. in Syrian refugees was also of the same order of magnitude as those reported in Qatar (71.1%) [43] and the United Arab Emirates (UAE) (44.4%) [44]. However, these two latter studies did not reflect the situation of the parasite in the local populations since the small size cohorts analyzed corresponded to migrant workers newly arriving in Qatar and UAE and originating from African, East Asian and West Asian countries.

Among the overall Syrian cohort, gender was not identified as a potential risk factor associated with *Blastocystis* sp. colonization, considering that both males and females have highly similar values of prevalence. This statement was in agreement with previous

epidemiological surveys conducted in Middle Eastern countries [4,43,44]. In the same way, no significant difference in prevalence of the parasite between the age classes in our data (0-14 years, 15-29 years and over 30 years) was reported. However, the prevalence of *Blastocystis* sp. was higher above the age of 30 years which could be explained by frequent reinfections or stable long term colonization of these adults by the parasite. Not surprisingly, WI status of ITS represented a risk factor for *Blastocystis* sp. infection, with prevalence of the parasite significantly higher in ITS without WI. This difference could easily be explained by the poor hygiene conditions and low level of water safety in ITS without WI, thus facilitating the transmission of the parasite. Indeed, intestinal parasites are usually considered as vectors of poverty related diseases as highlighted for instance by the high prevalence of *Blastocystis* sp. revealed in low-income African [9], Asian [11] and American countries [13]. Moreover, the prevalence of *Blastocystis* sp. was for instance reported to be significantly higher in schoolchildren of low socioeconomic status than in schoolchildren of high socioeconomic status in Lebanon [4]. In parallel, accumulating epidemiological data do not support a clear association between *Blastocystis* sp. infection and the presence of digestive symptoms [3,7,17] and this is also the case among the overall refugee population of the present study. Besides, no digestive symptoms were significantly identified more frequently within the cohort of *Blastocystis* sp. carriers. Nevertheless, abdominal pain was recorded as the most common digestive disorder in Syrian refugees colonized by the parasite as described in earlier studies [4,7,45].

Among the stool samples positive for *Blastocystis* sp. in the present survey, 15.9% of them (31/195) represented mixed infections consisting of at least two different STs according to the resulting sequence chromatograms. This relevant percentage revealed that mixed infections were common in the Syrian refugees as it was previously demonstrated in other cohorts [9,46], in link with a probable exposure of individuals to different sources of infection. In the ST analysis of the remaining 164 positive isolates corresponding to single infections, ST3 was the most commonly detected ST, followed by ST1 and ST2. This predominance of ST3, which is highly common in the human population worldwide [17,18,26], is also emphasized in the compiled studies from Lebanon (Table 2) along with the neighboring countries including Iran [37,47,48] and Saudi Arabia [39]. The only difference in ST distribution observed between Middle Eastern cohorts is that the ST1 was the second most common variant after ST3 within the Syrian refugees and in Saudi Arabia while it stands at the third position among the overall subtyped Lebanese isolates, but still with a high frequency. Since ST1 to ST3 are predominant in the human population [26] and less

frequently identified in animal groups [14], this strongly suggested that Syrian refugee infections by these STs were mostly correlated with large-scale inter-human transmission. Interestingly, ST4 with the focus being in Europe [41,45,49] was completely absent among individuals participating to this survey. In Middle Eastern countries, only one ST4 isolate has been previously identified in Lebanon [35] and no more than two dozen on a total of around 700 subtyped isolates in Iran [50-52]. In addition, it was pointed out that ST4 seems rare in regions with mainly Muslim population [26], situation that is highly probable in the current study, hypothesizing a potential link with eating habits or certain animal contacts of this population. Why ST4 is absent in certain areas of the world remains unknown although the hypothesis of a recent emergence of this ST in Europe probably associated with a zoonotic origin has been proposed [17]. Interestingly, the last isolate subtyped in Syrian refugees belonged to ST10. Until very recently, this ST had never been documented in humans worldwide, whereas it represents the most widely distributed ST in bovid [14,36]. In a large epidemiological study conducted in Africa [9], ST10 isolates were reported in two Senegalese individuals. As for the zoonotic ST10 isolate identified in the present study, the transmission of this ST may be due to direct contact with livestock or consumption of water contaminated by ST10 parasite cysts.

Furthermore, ST distribution of *Blastocystis* sp. was similar between ITS with or without WI and no significant association was demonstrated between ST and gender or age of the participants. Interestingly, no particular ST was consistently linked to the symptomatic status of refugees or digestive disorders such as abdominal pain or diarrhea. Numerous molecular studies have investigated the possibility of a link between *Blastocystis* sp. STs and symptoms and the corresponding results were contradictory [7,17], probably for two main reasons. The former is that it is almost impossible to exclude any other identifiable cause (other intestinal parasites, bacteria or virus) of the same digestive symptoms as those described for blastocystosis for each individual within a population. The second is that the clinical outcome of *Blastocystis* sp. infection by the same isolate from one individual to another may largely depend on the immunity and composition of the intestinal microbiota of the host [53] and on the genotype/virulence [22] of the parasite. Consequently, individual clinical case studies will remain the main source of information focusing on the potential link between ST and symptoms [20].

The next step of our survey was to investigate the intra-ST diversity of the three major STs (ST1 to ST3) reported in the Syrian refugee cohort. This diversity was determined through the identification of genotypes based on nucleotide differences at the SSU rDNA

locus among isolates and the evaluation of the ratio between the number of isolates and the number of genotypes (Table 3) as previously described [9]. ST1 was delineated to 5 different genotypes (ST-1 to ST1-5) with an average of 8.6 isolates per genotype. In case of ST2 and ST3, the number of genotypes was respectively 3 and 4 with an average ratio of 10.3 for ST2 and 22.3 for ST3. Considering only the number of genotypes, ST2 would appear to be the ST with the lower intra-ST diversity. However, this statement was invalidated by the analysis of the average isolates/genotypes ratios highlighting that ST3 had the lower intra-ST diversity in the present study followed by ST2 and ST1. Strikingly, the same approach targeting this domain of the 18S rDNA locus showed a similar pattern of intra-ST diversity for ST1 to ST3 among Senegalese isolates [9]. In addition, the lower intra-ST diversity of ST3 was also confirmed through the comparative analysis of draft *Blastocystis* sp. genomes from various STs [54]. None of the Syrian genotypes belonging to ST1, ST2 or ST3 was more frequently found according to age or WI status of ITS. Similarly, no genotype was significantly associated with the symptomatic status of the refugees or with the presence of abdominal pain or diarrhea.

In the Syrian cohort, the number of genotypes characterized was undoubtedly very low compared to the above-mentioned recent study conducted in Senegal [9]. Indeed, a total of 43 different genotypes were reported within the Senegalese cohort with a significant proportion of these genotypes represented by a limited number of isolates. These observations suggested the existence of multiple potential environmental sources of infection by the parasite in this rural region of Senegal in addition to large anthroponotic transmission. Within the Syrian cohort, it was therefore evident that human-to-human transmission was largely predominant, thus explaining the low number of genotypes found in this population. This could be explained on the one hand by the relatively low number of children enrolled in Lebanese schools (around 25%), who additionally attend school at different hours than Lebanese schoolchildren, thus limiting contacts between these two populations. On the other hand, only 15% of adult refugees have a professional activity outside the camp that is mostly related to agriculture in the vicinity of the settlements. Both statements could thus favor human-to-human transmission of the parasite among refugees within the ITS.

This assumption was also supported by the thorough comparative analysis of the *Blastocystis* sp. genotypes identified in Syrian refugees and those circulating in the local Lebanese population of North Lebanon. Strikingly, only 16.6% of the 277 Lebanese ST1 to ST3 isolates (Table 2) could be classified among the 12 Syrian genotypes. Moreover, Syrian genotypes ST1-4, ST3-4 and especially ST3-1 were not identified in the Lebanese population.

On this basis, we can hypothesize that the circulation/transmission of the parasite between local and refugee populations was quite restricted because of limited contact. Accordingly, genotype ST3-1 which is largely predominant in the Syrian cohort with around 90% of ST3 isolates was significantly more frequently identified in females. A suggested explanation may be that women are more likely to stay longer in the ITS during the day even though, like men, they also leave the settlements for work activities. Consequently, inter-human transmission undoubtedly perpetuates the over-representation of this genotype, especially in this group of refugees and promiscuity in some of the ITS obviously facilitates such a transmission. In contrast, genotype ST1-5 which represents only about 30% of the Syrian ST1 isolates was overrepresented in males. Since this genotype has also been reported in the Lebanese population, it can therefore be proposed that Syrian males harboring ST1-5 could have been contaminated through an external source as a result of their participation in outdoor activities. Another underlying hypothesis that could be tested in future epidemiological studies would be the circulation of this genotype in the different countries of the Middle East and the Arabian Gulf.

5. Conclusion

The present survey is the first to provide epidemiological data on the prevalence and distribution of *Blastocystis* sp. STs and genotypes in the Syrian population, giving a more comprehensive view of the parasite burden in Middle Eastern countries. The prevalence observed in our cohort of Syrian refugees living in ITS in North Lebanon is significant since it exceeds 60%, highlighting the active circulation of the parasite in this population. Moreover, by comparing the prevalence of the parasite in ITS with or without WI, it is clearer that poorer access to water, sanitation and hygiene promotion awareness favor the transmission of *Blastocystis* sp. in such an environment. In parallel, the comparative analysis of the STs and genotypes identified in the Syrian refugees and local North Lebanese population strongly suggests that *Blastocystis* sp. is mainly transmitted through the inter-human route in the Syrian cohort and that the circulation of the parasite between the refugee and host communities remains limited. Screening programs of intestinal protozoa together with the implementation of prevention and health education measures, sanitary facilities and water quality monitoring are thus urgently needed in the ITS to improve the health status of the refugees and prevent the spread of the parasites among refugees and to the host population.

Acknowledgments: The authors are grateful to all those who participated in the study, especially the staff of the non-governmental organizations Concern Worldwide and Solidarités International.

Funding: This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Institut Pasteur of Lille, the University of Lille, the University Catholic of Lille, the CHRU of Lille, the Lebanese University and the non-governmental organizations Concern Worldwide and Solidarités International. SK and MS were supported by PhD fellowships from the AZM & Saade Association of Lebanon and University of Lille, respectively.

Author contributions: Conceptualization, Dima El Safadi, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze and Eric Viscogliosi; Formal analysis, Salma Khaled, Nausicaa Gantois and Aisha Ayoubi; Funding acquisition, Eric Viscogliosi; Investigation, Salma Khaled, Nausicaa Gantois, Aisha Ayoubi, Gaël Even, Manasi Sawant, Sadia Benamrouz-Vanneste, Magali Chabé, Gabriela Certad, Dima El Safadi, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze and Eric Viscogliosi; Project administration, Jinane El Houmayraa, Mathieu Nabot, Dima El Safadi, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze and Eric Viscogliosi; Resources, Salma Khaled, Aisha Ayoubi, Jinane El Houmayraa, Mathieu Nabot, Dima El Safadi and Eric Viscogliosi; Software, Salma Khaled, Nausicaa Gantois, Gaël Even, Manasi Sawant and Eric Viscogliosi; Supervision, Dima El Safadi, Fouad Dabboussi and Eric Viscogliosi; Validation, Jinane El Houmayraa, Mathieu Nabot, Gabriela Certad, Dima El Safadi, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze and Eric Viscogliosi; Writing – original draft, Eric Viscogliosi; Writing – review & editing, Salma Khaled, Nausicaa Gantois, Manasi Sawant, Gabriela Certad, Dima El Safadi and Eric Viscogliosi.

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Stenzel, D.J.; Boreham, P.F.L. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* **1996**, *9*, 563-584.
2. Tan, K.S.W. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet. Parasitol.* **2004**, *126*, 121–144.

3. Wawrzyniak, I.; Poirier, P.; Viscogliosi, E.; Meloni, D.; Texier, C.; Delbac, F.; El Alaoui, H. *Blastocystis*, an unrecognized parasite : an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2013**, *1*, 167-178.
4. Osman, M.; El Safadi, D.; Cian, A.; Benamrouz, S.; Nourrisson, C.; Poirier, P.; Pereira, B.; Razakandrainibe, R.; Pinon, A.; Lambert, C.; et al. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004496.
5. Scanlan, P.D.; Stensvold, C.R. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* **2013**, *29*, 523-529.
6. 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*, 391-396.
7. Tan, K.S.W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 639–665.
8. El Safadi, D.; Gaayeb, L.; Meloni, D.; Cian, A.; Poirier, P.; Wawrzyniak, I.; Delbac, F.; Dabboussi, F.; Delhaes, L.; Seck, M.; et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 164.
9. Khaled, S.; Gantois, N.; Tidjani Ly, A.; Senghor, S.; Even, G.; Dautel, E.; Dejager, R.; Sawant, M.; Baydoun, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; et al. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese school children. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1408.
10. Lokmer, A.; Cian, A.; Froment, A.; Gantois, N.; Viscogliosi, E.; Chabé, M.; Ségurel, L. Use of shotgun metagenomics for the identification of protozoa in the gut microbiota of healthy individuals from worldwide populations with various industrialization levels. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211139.
11. Noradilah, S.A.; Moktar, N.; Anuar, T.S.; Lee, I.L.; Salleh, F.M.; Manap, S.N.A.A.; Mohtar, N.S.H.M.; Azrul, S.M.; Abdullah, W.O.; Nordin, A.; et al. Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 360.
12. Rojas-Velazquez, L.; Maloney, J.G.; Molokin, A.; Moran, P.; Serrano-Vazquez, A.; Gonzalez, E.; Perez-Juarez, H.; Ximenez, C.; Santin, M. Use of next-generation amplicon sequencing to study *Blastocystis* genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 566.

13. Higuera, A.; Villamizar, X.; Herrera, G.; Giraldo, J.C.; Vasquez-A, L.R.; Urbano, P.; Villalobos, O.; Tovar, C.; Ramirez, J.D. Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ* **2020**, *8*, e8554.
14. 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. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169659.
15. Wang, W.; Owen, H.; Traub, R.J.; Cuttell, L.; Inpankaew, T.; Bielefeldt-Ohmann, H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* **2014**, *203*, 264-269.
16. Greige, S.; El Safadi, D.; Bécu, N.; Gantois, N.; Pereira, B.; Chabé, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; Certad, G.; El Hage, R.; Chemaly, M.; et al. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 389.
17. Clark, C.G.; van der Giezen, M.; Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* **2013**, *82*, 1-32.
18. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* **2016**, *65*, 763-771.
19. Andersen, L.O.; Stensvold, C.R. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 524-528.
20. Fréal, E.; El Safadi, D.; Cian, A.; Aubry, E.; Certad, G.; Osman, M.; Wacrenier, A.; Dutoit, E.; Creusy, C.; Dubos, F.; et al. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.*, **2015**, *21*, 91-94.
21. Salvador, F.; Sulleiro, E.; Sanchez-Montalva, A.; Alonso, C.; Santos, J.; Fuentes, I.; Molina, I. Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis* sp. infection in Barcelona, Spain. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 548.
22. Ajjampur, S.S.; Tan, K.S.W. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int.* **2016**, *65*, 772-779.
23. Gentekaki, E.; Curtis, B.A.; Stairs, C.W.; Klimes, V.; Elias, M.; Salas-Leiva, D.E.; Herman, E.K.; Eme, L.; Arias, M.C.; Henrissat, B.; et al. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2003769.
24. Noël, 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. Molecular phylogenies of

- Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, 43, 348-355.
25. Stensvold, C.R.; Suresh, G.K.; Tan, K.S.; Thompson, R.C.; Traub, R.J.; Viscogliosi, E.; Yoshikawa, H.; Clark, C.G. Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol.* **2007**, 23, 93-96.
 26. Alfellani, M.A.; Taner-Mulla, D.; Jacob, A.S.; Imeede, C.A.; Yoshikawa, H.; Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* **2013**, 164, 497-509.
 27. Yoshikawa, H.; Koyama, Y.; Tsuchiya, E.; Takami, K. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol. Int.* **2016**, 65, 750-759.
 28. Zhao, G.H.; Hu, X.F.; Liu, T.L.; Hu, R.S.; Yu, Z.Q.; Yang, W.B.; Wu, Y.L.; Yu, S.K.; Song, J.K. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitol. Res.* **2017**, 116, 2327-2333.
 29. Maloney, J.G.; Lombard, J.E.; Urie, N.J.; Shivley, C.B.; Santin, M. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US preweaned dairy heifer calves. *Parasitol. Res.* **2019**, 118, 575-582.
 30. Gantois, N.; Lamot, A.; Seesao, Y.; Creusy, C.; Li, L.L.; Monchy, S.; Benamrouz-Vanneste, S.; Karpouzopoulos, J.; Bourgain, J.L.; Rault, C.; et al. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in edible marine fish and marine mammals: a large-scale study conducted in Atlantic Northeast and on the coasts of Northern France. *Microorganisms* **2020**, 8, 460.
 31. Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R.; Vidal-Lapiedra, A.; Onuoha, E.S.; Fagbenro-Beyioku, A.F.; Clark, C.G. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* **2013**, 126, 11-18.
 32. Ramírez, J.D.; Sánchez, A.; Hernández, C.; Florez, C.; Bernal, M.C.; Giraldo, J.C.; Reyes, P.; Lopez, M.C.; Garcia, L.; Cooper, P.J.; et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, 41, 32-35.
 33. Jimenez, P.A.; Jaimes, J.E.; Ramirez, J.D. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasit. Vectors* **2019**, 12, 376.
 34. Stensvold, C.R.; Alfellani, M.A.; Norskov-Lauritsen, S.; Prip, K.; Victory, E.L.; Maddox, C.; Nielsen, H.V.; Clark, C.G. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* **2009**, 39, 473-479.

35. El Safadi, D.; Meloni, D.; Poirier, P.; Osman, M.; Cian, A.; Gaayeb, L.; Wawrzyniak, I.; Delbac, F.; El Alaoui, H.; Delhaes, L.; et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *88*, 1203-1206.
36. Greige, S.; El Safadi, D.; Khaled, S.; Gantois, N.; Baydoun, M.; Chemaly, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; Chabé, M.; Osman, M.; Certad, G.; et al. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission. *Acta Trop.* **2019**, *194*, 23-29.
37. Moosavi, A.; Haghighi, A.; Nazemalhosseini, E.; Zayeri, F.; Alebouyeh, M.; Khazan, H.; Kazemi, B.; Zali, M.R. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitol. Res.* **2012**, *111*, 2311-2315.
38. Alinaghizade, A.; Mirjalali, H.; Mohebbali, M.; Stensvold, C.R.; Rezaeian, M. Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *50*, 77-82.
39. Mohamed, R.T.; El-Bali, M.A.; Mohamed, A.A.; Abdel-Fatah, M.A.; El-Malky, M.A.; Mowafy, N.M.; Zaghloul, D.A.; Bakri, R.A.; Al-Harathi, S.A. Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 174.
40. Ghanem, N. Local governance under pressure: Research on social stability in T5 area, North Lebanon. Menapolis and OXFAM Italia, **2016**. Available from: <https://reliefweb.int/report/lebanon/local-governance-under-pressure-research-social-stability-t5-area-north-lebanon>
41. Poirier, P.; Wawrzyniak, I.; Albert, A.; El Alaoui, H.; Delbac, F.; Livrelli, V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 975–983.
42. Badparva, E.; Sadraee, J.; Kheirandish, F.; Frouzandeh, M. Genetic diversity of human *Blastocystis* isolates in Khorramabad, central Iran. *Iran J. Parasitol.* **2014**, *9*, 44-49.
43. Abu-Madi, M.; Aly, M.; Behnke, J.M.; Clark, C.G.; Balkhy, H. The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 465.
44. AbuOdeh, R.; Ezzedine, S.; Samie, A.; Stensvold, C.R.; ElBakri, A. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *37*, 158-162.

45. El Safadi, D.; Cian, A.; Nourrisson, C.; Pereira, B.; Morelle, C.; Bastien, P.; Bellanger, A.P.; Botterel, F.; Candolfi, E.; Desoubeaux, G.; et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect. Dis.* **2016**, 16, 451.
46. Scanlan, P.D.; Stensvold, C.R.; Cotter, P.D. Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, 81, 4071-4076.
47. Riabi, T.R.; Mirjalali, H.; Haghghi, A.; Nejad, M.R.; Pourhoseingholi, M.A.; Poirier, P.; Delbac, F.; Wawrzyniak, I.; Zali, M.R. Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, 61, 119-126.
48. Shirvani, G.; Fasihi-Harandi, M.; Raiesi, O.; Bazargan, N.; Zahedi, M.J.; Sharifi, I.; Kalantari-Khandani, B.; Nooshadokht, M.; Shabandoust, H.; Mohammadi, M.A.; et al. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from patients with irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and chronic urticaria in Iran. *Acta Parasitol.* **2020**, 65, 90-96.
49. Forsell, J.; Granlund, M.; Stensvold, C.R.; Clark, C.G.; Evengard, B. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, 31, 1689-1696.
50. Khoshnood, S.; Rafiei, A.; Saki, J.; Alizadeh, K. Prevalence and genotype characterization of *Blastocystis hominis* among the Baghmalek people in Southwestern Iran in 2013 – 2014. *Jundishapur J. Microbiol.* **2015**, 8, e23930.
51. Khademvatan, S.; Masjedizadeh, R.; Rahim, F.; Mahbodfar, H.; Salehi, R.; Yousefi-Razin, E.; Foroutan, M. *Blastocystis* and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitol. Int.* **2017**, 66, 142-145.
52. Piranshahi, A.R.; Tavalla, M.; Khademvatan, S. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* isolates in patients with HIV-positive using locus SSU-rDNA. *J. Parasit. Dis.* **2018**, 42, 28-33.
53. Audebert, C.; Even, G.; Cian, A.; *Blastocystis* Investigation Group; Loywick, A.; Merlin, S.; Viscogliosi, E.; Chabé M. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 25255.

54. Beghini, F.; Pasolli, E.; Truong, T.D.; Putignani, L.; Caccio, S.M.; Segata, N. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *ISME J.* **2017**, 11, 2848-2863.

Discussion

DISCUSSION

Situation de la blastocystose au Sénégal et plus globalement en Afrique

Malgré l'impact socioéconomique et en santé publique majeur de *Blastocystis* sp., seules quelques rares études moléculaires fournissent à ce jour des informations sur la prévalence et la distribution des STs de ce parasite dans la population africaine. Or, la plupart des pays africains sont considérés comme étant à haut risque d'infection par *Blastocystis* sp. en raison d'un accès insuffisant à un assainissement et à une eau potable favorisant ainsi la transmission du parasite. À ce jour, les données moléculaires disponibles concernent surtout quelques pays d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale tels que le Nigeria (Poulsen *et al.* 2016), la Côte d'Ivoire (D'Alfonso *et al.* 2017), le Sénégal (El Safadi *et al.* 2014) ou le Cameroun (Lokmer *et al.* 2019). En outre, ces enquêtes épidémiologiques n'englobent que des cohortes très limitées en termes de nombre de participants et ne fournissent ainsi que des tendances. Par conséquent, il est nécessaire de poursuivre ces études épidémiologiques en Afrique afin de clarifier la prévalence et la distribution des STs tout comme les sources potentielles de transmission de ce parasite à l'Homme. Aussi, le principal objectif de ce premier article de ma thèse a été d'analyser la circulation de *Blastocystis* sp. dans une population d'écoliers sénégalais vivant dans 10 villages localisés dans deux régions du nord-ouest du pays (**Article 1 Figure 1**). C'est à la fois la première enquête multicentrique menée en Afrique mais aussi la plus large étude épidémiologique jamais réalisée sur ce continent.

La prévalence globale du parasite observée dans cette cohorte composée de 731 écoliers sénégalais et déterminée par PCR en temps réel atteignait les 80% soulignant ainsi la large circulation de *Blastocystis* sp. dans ce pays (**Article 1 Table 2**). D'ailleurs, cette valeur de prévalence est assez proche des 100% rapportée précédemment pour un groupe d'une centaine d'enfants sénégalais vivant dans le district de Podor situé plus au nord du pays (El Safadi *et al.* 2014). Cette valeur globale de prévalence a pu aussi être comparée à celles rapportées pour d'autres pays africains via l'utilisation de méthodes moléculaires (**Article 1 Table 4**). En effet, on sait que les méthodes non moléculaires telles que l'observation microscopique de selles fraîches sous-estiment fortement la réelle prévalence du parasite (Forsell *et al.* 2016; Osman *et al.* 2016; Poirier *et al.* 2011). Globalement, on note que la prévalence de *Blastocystis* sp. est comprise entre 25,6 et 100% selon les pays. En se focalisant sur les pays d'Afrique de l'Ouest voisins du Sénégal, la prévalence de *Blastocystis* sp. est de 58,2% (D'Alfonso *et al.* 2017) et de 70% (Iebba *et al.* 2016) dans deux enquêtes menées en Côte d'Ivoire et de 49,7% au Mali (Kodio *et al.* 2019). Trois autres études de terrain ont montré une prévalence de 49% (Alfellani *et al.* 2013a) et de 84% (Poulsen *et al.* 2016) au

DISCUSSION

Nigeria et d'environ 70% au Liberia (Alfellani *et al.* 2013a). Toutes ces données épidémiologiques soulignent la forte prévalence du parasite en Afrique, avec une moyenne de plus de 50 % dans de nombreuses régions. Il est donc clair que ces valeurs importantes dans ces pays en développement sont associées au péril fécal en lien avec des conditions sanitaires précaires et une qualité insuffisante de l'eau de consommation.

Si on analyse séparément les deux régions du Sénégal dont sont originaires les écoliers participant à notre étude, la prévalence de *Blastocystis* sp. est du même ordre de grandeur dans la région de Saint-Louis (83,5%) que dans celle du lac de Guiers (77,4%). Par contre, une large variation de prévalence est observée entre les villages de ces deux zones puisque la fréquence du parasite est comprise entre 51,7 et 100% (**Article 1 Table 2**). Une telle variabilité pouvant aller du simple au double peut difficilement s'expliquer par de simples différences dans les conditions sanitaires rencontrées d'un village à l'autre puisque l'habitat est généralement de type urbain dans tous ces villages et que tous les participants à cette étude utilisent des latrines. En revanche, les origines diverses des sources d'eau utilisées par les habitants pour la consommation, pour les activités domestiques et pour les cultures irriguées qui peuvent être potentiellement contaminées par des excréments humains et/ou animaux, pourraient expliquer cette variabilité de fréquence de ce parasite à transmission hydrique (**Article 1 Table 1**). Par exemple, la plus forte prévalence de *Blastocystis* sp. a été observée dans le village de Ndiawdoune qui est le seul, dans la région de Saint-Louis, à être situé sur les rives du fleuve Ngalam. Ce fleuve pourrait alors présenter un niveau potentiel de contamination par *Blastocystis* sp. plus élevé que ceux des fleuves Sénégal ou Lampar. Pour ce qui est des villages de la région du lac de Guiers, les sources d'eau ont tendance à être plus diversifiées que celles de la région de Saint-Louis même si l'eau de ce lac reste la principale source des villageois. Il est intéressant de noter un gradient croissant de la prévalence de *Blastocystis* sp. dans ces villages, allant du nord au sud du lac de Guiers. En effet, Mbane, le village le plus septentrional de cette région affiche une prévalence de 51,7%, suivi au sud par Diokhor Tack (76%), puis plus au sud encore par les villages de Foss, Malla et Malla Tack avec pour chacun, une prévalence atteignant ou dépassant les 90%. Mbane est le village le plus proche de la zone géographique dans laquelle le lac de Guiers est alimenté par la rivière Taouey. Dans cette zone plus mouvementée, la stagnation de l'eau et des débris fécaux pourrait être réduite et donc associée à une contamination plus limitée des habitants de Mbane. D'autre part, l'eau du lac qui s'écoule vers les villages situés plus au sud dans un système aquatique fermé pourrait stagner et accumuler des débris fécaux provenant de villages situés plus au nord, augmentant ainsi potentiellement le risque d'infection par

DISCUSSION

Blastocystis sp. Cette stagnation à proximité des points d'eau de ces villages est également importante en raison de l'extrême densité de la végétation aquatique sur les rives du lac.

Sur les 588 échantillons positifs, 23% d'entre eux correspondaient à des infections mixtes pour lesquelles les isolats n'ont pas été sous-typés. Pour les 453 isolats restant correspondant à des infections simples, le ST2 était largement prédominant (49,9% des isolats sous-typés), suivi du ST1 (24,9%) du ST3 (23,6%), du ST7 (0,7%) et des ST10 et ST14 (0,45% chacun). Cette distribution est légèrement différente de celle déterminée précédemment pour des enfants du district de Podor au Sénégal qui faisait état de la prédominance du ST3 suivi du ST1 et du ST2 (El Safadi *et al.* 2014) (**Article 1 Table 4**). Dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest comme au Nigeria (Alfellani *et al.* 2013a ; Poulsen *et al.* 2016) et en Côte d'Ivoire (D'Alfonso *et al.* 2017), le ST1 est quant à lui prédominant suivi du ST2 ou du ST3. Des variations dans la distribution des STs ont également été observées entre les autres régions africaines puisque le ST3 est prédominant en Afrique centrale (Dacal *et al.* 2018; Lokmer *et al.* 2019) ainsi qu'en Afrique du Nord (Ben Abda *et al.* 2017; El Deeb and Khodeer 2013; Fouad *et al.* 2011; Hameed *et al.* 2011; Soupart *et al.* 2010) à l'exception cependant de la Libye, pays pour lequel le ST1 semblerait être le ST le plus fréquent (Abdulsalam *et al.* 2013; Alfellani *et al.* 2013a) comme c'est d'ailleurs aussi le cas en Afrique australe (Greigert *et al.* 2018). Bien qu'il soit nécessaire de rappeler que toutes ces données sont souvent basées sur un nombre limité d'individus pour chaque étude, une variation géographique dans la fréquence des trois principaux STs de *Blastocystis* sp. (ST1, ST2 et ST3) est clairement rapportée entre les régions africaines ou au sein d'un même pays ce qui pourrait simplement refléter une exposition des populations à des sources d'infection différentes qu'elles soient environnementales et/ou animales. Cette variation a également été décrite entre régions d'un même pays comme c'est le cas dans notre étude. En effet, le ST3 est le plus fréquent dans la région de Saint-Louis alors que le ST2 est majoritaire dans la région du lac de Guiers. De même au Nigeria, alors que le ST2 est le deuxième ST le plus fréquemment identifié dans une communauté vivant dans la ville d'Ilero (État d'Oyo) (Poulsen *et al.* 2016), ce ST n'a même pas été détecté chez des patients fréquentant une clinique à Lagos (État de Lagos) (Alfellani *et al.* 2013a).

Globalement, les ST1, ST2 et ST3 représentent la grande majorité des isolats humains identifiés au Sénégal et plus généralement en Afrique avec 95,1% (1550/1630) du total des isolats sous-typés jusqu'à présent sur ce continent, avec une prédominance globale du ST3 (**Article 1 Table 4**). Comme ces trois STs sont très fréquemment présents dans la population humaine et plus rarement chez les animaux (Cian *et al.* 2017; Hublin *et al.* 2020; Ning *et al.*

DISCUSSION

2020), on peut en conclure que les infections chez l'Homme par ces 3 STs sont principalement le résultat d'une transmission interhumaine à grande échelle, qui peut être raisonnablement accentuée dans les pays en développement tels que le Sénégal. D'ailleurs, une augmentation du nombre de cas de maladies hydriques chez les humains et les animaux vivant dans le bassin du fleuve Sénégal a été signalée ces dernières années (Michel *et al.* 2011). Il est intéressant de noter que le ST4 n'a pas été identifié dans la présente enquête épidémiologique et qu'au total, seuls neuf isolats de ST4 ont été caractérisés en Afrique sur les 1630 isolats sous-typés à ce jour sur ce continent soit 0,55% (**Article 1 Table 4**) alors qu'il est fréquent principalement en Europe (Alfellani *et al.* 2013a; El Safadi *et al.* 2016; Poirier *et al.* 2011). Cette observation soutient donc l'hypothèse d'une émergence récente de ce ST dans la population européenne (Clark *et al.* 2013).

Au Sénégal, trois cas d'infection par le ST7 ont été identifiés dans notre étude. Or, il a été confirmé que le ST7, tout comme le ST6, est un ST adapté aux oiseaux compte tenu de leur forte prédominance chez ce groupe d'animaux (Cian *et al.* 2017; Greige *et al.* 2018; Hublin *et al.* 2020). En Afrique, ces deux ST ne représentent à eux deux qu'environ 4% des isolats humains sous-typés (**Article 1 Table 4**). L'origine la plus probable de ces isolats de ST7 est donc zoonotique via un contact supposé direct ou indirect avec des volailles d'élevage. Pour compléter cette vue d'ensemble, les ST10 et ST14 ont aussi été identifiés chez quatre écoliers vivant dans des villages différents, ce qui indique des sources de contamination indépendantes. De nombreuses études ont rapporté que les ST10 et ST14 étaient largement prédominants chez les bovins, suggérant fortement que ces deux STs pouvaient être considérés comme adaptés à ce groupe d'animaux (Cian *et al.* 2017; Hublin *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2017). Cela sera d'ailleurs confirmé dans la seconde étude de ma thèse (**Article 2**). Cependant, malgré la forte prévalence de ces deux STs chez les bovins et les contacts répétés et à long terme avec ces animaux en particulier pour les éleveurs, les ST10 et ST14 n'avaient encore jamais été documentés dans la population humaine avant cette étude (Clark *et al.* 2013; Stensvold et Clark 2016). Comme pour le ST7, le mode de transmission des ST10 et ST14 à l'Homme demeure spéculatif et peut être soit par contact direct avec le bétail, soit indirect via la consommation d'eau contaminée par des selles animales. Il est d'ailleurs à noter que le ST10 a déjà été détecté dans des échantillons d'eau de rivière collectés par exemple en Malaisie (Noradilah *et al.* 2016).

Vu le grand nombre d'isolats sous-typés dans notre étude, la diversité intra-ST des trois principaux STs identifiés dans notre cohorte sénégalaise (ST1 à ST3) a pu être étudiée de manière approfondie en identifiant les différents génotypes de ces STs sur la base des

DISCUSSION

variations de séquences observées entre isolats au niveau du gène de l'ARNr 18S (**Article 1 Figure 2 et Table 3**). Si on analyse les rapports nombre d'isolats sur nombre de génotypes pour chacun de ces 3 STs, on peut constater que le ST1 est le ST présentant la plus grande diversité intra-ST suivi du ST2 et du ST3. À titre de comparaison, très peu d'études se sont focalisées sur cette diversité génétique intra-ST et presque toutes étaient basées sur l'analyse des séquences d'un autre domaine du gène de l'ARNr 18S que celui ciblé dans notre étude (Clark *et al.* 2013; Stensvold *et al.* 2012). L'analyse de ce deuxième « marqueur » a aussi permis de mettre en évidence une large diversité génétique du parasite au niveau intra-ST dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. C'est le cas en Chine où le ST2 présentait la plus grande diversité intra-ST (Qi *et al.* 2020) et au Nigéria où le ST3 était le ST le plus divergent (Poulsen *et al.* 2016). Cette diversité intra-ST peut aussi être fluctuante entre différentes régions d'un même pays comme le montrent deux études menées en Colombie. Dans l'une de ces études (Ramírez *et al.* 2017), la plus grande diversité intra-ST a été signalée pour le ST2 suivi du ST1 et du ST3 tandis que dans la seconde enquête (Higuera *et al.* 2020), le ST2 était toujours le ST le plus divergent mais devant le ST3 puis le ST1. Globalement, nos données couplées à celles obtenues lors de ces études précédentes ont mis en évidence la plus faible diversité génétique intra-ST du ST3 par rapport aux ST1 et ST2. Cela a d'ailleurs été confirmé par l'analyse comparative d'un grand nombre de séquences de génomes de *Blastocystis* sp. reconstruits *in silico* à partir de données de métagénomique (Beghini *et al.* 2017).

Les ST1 et ST2 sont connus pour pouvoir coloniser différents groupes d'animaux alors que le ST3 infecte principalement l'Homme (Cian *et al.* 2017; Hublin *et al.* 2020). Le ST3 aurait donc de fait une plus forte spécificité d'hôte (Stensvold *et al.* 2012) et la plupart des infections à ST3 chez l'Homme seraient ainsi causées par une transmission anthroponique. Cela s'est confirmé dans la présente étude puisque trois des huit génotypes de ST3 identifiés représentent plus de 90 % des isolats ST3. Les cinq autres génotypes de ST3 représentés par seulement un à trois isolats seraient quant à eux probablement en lien avec un réservoir d'infection extérieur et possiblement environnemental. Ces observations expliquent la plus faible diversité intra-ST du ST3. En revanche, de nombreux génotypes identifiés dans la population sénégalaise et appartenant au ST1 ou au ST2 sont représentés par un seul isolat, ce qui implique une possible exposition des villageois à différentes sources d'infection ou à quelques sources contenant plusieurs génotypes. Ces sources potentielles pourraient donc être multiples et propres à certains villages comme décrit par exemple pour les villages de Ndiol Maure et de Malla Tack. Par conséquent, même si une partie des infections par ST1 ou ST2

DISCUSSION

est liée à une transmission interhumaine dans notre cohorte sénégalaise, une grande partie d'entre elles serait le résultat d'une contamination sporadique provenant de différents réservoirs bien localisés. Cette transmission à l'Homme via de multiples voies pour les ST1 et ST2 permet de comprendre la plus grande diversité génétique intra-ST observée pour ces deux STs en comparaison à celle du ST3. De futures études devront être menées pour détecter la présence du parasite dans les échantillons animaux et environnementaux prélevés à proximité de ces villages.

Prévalence et distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la filière bovine et dans la population humaine au Nord-Liban

Comme détaillé précédemment, plusieurs STs de *Blastocystis* sp. identifiés dans la population humaine sont considérés comme étant d'origine animale et potentiellement zoonotiques. C'est le cas du ST5 qui infecte fréquemment les porcs et qui a été trouvé avec une prévalence anormalement élevée chez les ouvriers d'élevages intensifs de porcs (Wang *et al.* 2014) mais c'est aussi le cas du ST6 qui est prédominant chez les oiseaux et transmissible par exemple au personnel d'abattoirs de volailles (Greige *et al.* 2018). Au vu de ces données, il est devenu nécessaire de déterminer la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez d'autres groupes d'animaux tels que les bovins et d'analyser leur potentiel comme réservoir de transmission du parasite à l'Homme. Dans les enquêtes d'épidémiologie moléculaire récentes incluant un grand nombre de spécimens (Lee *et al.* 2018; Masuda *et al.* 2018; Wang *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2017), la prévalence du parasite chez les vaches laitières et à viande variait entre 6,7% et 54,1% selon les pays. Cette prévalence potentiellement importante de *Blastocystis* sp. chez les bovins pourrait donc induire un risque de transmission zoonotique, en particulier chez les éleveurs. En outre, la plupart de ces études moléculaires ont identifié les ST10 et ST14 comme les STs prédominants chez ces animaux suggérant que les bovins seraient les hôtes naturels de ces deux STs.

Les objectifs de la seconde enquête épidémiologique de ma thèse étaient donc d'abord d'obtenir les premières données moléculaires concernant la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez les vaches laitières au Liban et de confirmer que les bovins représentaient bien les hôtes naturels des ST10 et ST14. Pour ce faire, 254 échantillons de selles de vaches laitières ont été collectés dans 55 fermes du Nord-Liban puis analysés pour la présence de *Blastocystis* sp. par PCR en temps réel. La prévalence observée est très importante puisqu'elle dépasse les 63% dans ce cheptel. Cependant, même importante, cette

DISCUSSION

prévalence est finalement très similaire à celles déterminées par des méthodes moléculaires dans plusieurs autres pays comme au Japon (54,1%) (Masuda *et al.* 2018), en Thaïlande (50%) (Udonsom *et al.* 2018), en Colombie (80%) (Ramírez *et al.* 2014) ou bien encore en Libye (41,7%) (Alfellani *et al.* 2013a). Par contre, cette prévalence au Liban est beaucoup plus élevée que celles observées en Corée (6,7%) (Lee *et al.* 2018), en Chine (9,5 % et 10,3 %, respectivement) (Wang *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2017), en Iran (9,6%) (Badparva *et al.* 2015), au Royaume-Uni (22,6%) (Alfellani *et al.* 2013a) ou aux États-Unis (19,1%) (Fayer *et al.* 2012). Ainsi, même si on note une large variation géographique de la prévalence de *Blastocystis* sp. dans ce cheptel bovin, ce parasite a clairement une répartition et un impact mondial induisant de fait un risque potentiel de transmission à l'Homme.

Au contraire des cochons et des poulets (Greige *et al.* 2018; Wang *et al.* 2014), aucune étude n'a été programmée afin d'évaluer ce risque de transmission pour les bovins d'élevage. Ceci a donc été réalisé pour la première fois dans mon enquête puisque les selles de 40 éleveurs de vaches laitières en contact direct avec leur bétail ont pu être collectées en parallèle à celles des animaux. De plus, les selles d'un groupe composé de 40 personnes suivies pour différentes pathologies dans un hôpital de Tripoli ont été obtenues. Cette seconde cohorte a pu nous servir de groupe témoin puisque les individus la composant ont déclaré n'avoir aucun contact avec du bétail. La prévalence du parasite est de 52,5% chez les éleveurs et du même ordre de grandeur (57,5%) dans le groupe contrôle. Il est intéressant de noter que le taux d'infection observé dans chacun de ces deux groupes est très similaire à celui observé toujours au Nord-Liban dans une cohorte d'écoliers (63,0%) (Osman *et al.* 2016) ainsi que dans deux groupes de personnes travaillant dans un abattoir de volailles (56,0%) ou hospitalisés à Tripoli (54,0%) (Greige *et al.* 2018). Ces valeurs de prévalence dépassant toutes les 50% indiquent clairement que *Blastocystis* sp. circule très activement au sein de la population du Nord-Liban et ce quelque soit la catégorie professionnelle ou la classe d'âge. D'autre part, même si les cohortes humaines analysées dans notre étude sont restreintes, nos données ne montrent pas *a priori* un risque plus élevé d'infection par *Blastocystis* sp. chez les éleveurs malgré un contact fréquent avec le bétail.

Dans un second temps, la diversité génétique des isolats de *Blastocystis* sp. a été explorée au sein de la cohorte de bovins et des deux cohortes humaines. Sur les 125 isolats sous-typés chez les vaches laitières, 44% d'entre eux correspondent au ST10 et 37% au ST14 soit plus de 80% des isolats pour ces deux STs (**Article 2 Table 1**). Le reste des isolats appartiennent aux ST1, ST2, ST3, ST5 et ST7 en des proportions variables avec pour la toute première fois, l'identification des ST2 et ST7 chez les bovins. Si on synthétise toutes les

DISCUSSION

données de sous-typage d'isolats de bovins domestiques à travers le monde (**Article 2 Table 2**), les ST10 et ST14 sont de loin les plus fréquents avec 73% du total de ces isolats. Cette prédominance s'observe par exemple au Japon (Masuda *et al.* 2018), en Corée (Lee *et al.* 2018), en Chine (Zhu *et al.* 2017) ou en Libye (Alfellani *et al.* 2013a). En outre, les ST10 et ST14 ont été les seuls STs identifiés chez des bovins aux États-Unis (Fayer *et al.* 2012; Santín *et al.* 2011). Toutes ces données comme celles de mon étude confirment donc que les bovins domestiques sont bien les hôtes naturels des ST10 et ST14 de *Blastocystis* sp.

Pour ce qui est des deux cohortes humaines de mon étude, la distribution des STs est très similaire puisque le ST3 est prédominant dans chacune d'entre elles suivi du ST1 ou du ST2 selon la cohorte (**Article 2 Table 1**). Il est frappant de constater que cette distribution avec prédominance du ST3 suivi du ST1 ou du ST2 est également celles rapportées chez des patients hospitalisés à Tripoli, chez le personnel travaillant dans des abattoirs de volailles au Nord-Liban (Greige *et al.* 2018) et chez des écoliers de Tripoli (Osman *et al.* 2016). Ainsi chez les éleveurs de bétail, aucun autre ST n'a été détecté en dehors des ST1 à ST3. Cela sous-entend que malgré la forte prévalence des ST10 et ST14 dans le bétail, aucun de ces deux STs n'a été identifié chez les éleveurs bien que ces derniers soient en contact direct, à long terme et répété avec ces animaux. Plus globalement, et jusqu'à ma thèse et en particulier jusqu'à la réalisation de cette étude au Liban, ces deux STs n'avaient jamais été documentés dans les infections humaines à travers le monde (Clark *et al.* 2013; Stensvold et Clark 2016), suggérant que l'Homme ne serait pas sensible à l'infection par ces deux STs. Nous avons aussi émis l'hypothèse que ces deux STs pouvaient produire des formes kystiques non résistantes dans l'environnement voire même ne produire aucun kyste, empêchant ainsi toute transmission possible de ces deux STs du parasite à un autre hôte par contact indirect. En fait, dans la première étude de ma thèse menée au Sénégal et postérieure à l'étude présente (**Article 1**), le ST10 et le ST14 ont été identifiés chez des écoliers remettant ainsi en cause les hypothèses émises ci-dessus. Un autre cas d'infection par le ST10 a aussi été rapporté dans la troisième étude de ma thèse chez un réfugié syrien (**Article 3**).

Pour terminer avec cette étude, le ST5 a été identifié chez les vaches laitières libanaises tout comme le ST7. Or ces deux STs sont respectivement adaptés aux porcs et aux oiseaux (Greige *et al.* 2018; Wang *et al.* 2014). Aussi leur présence épisodique chez les bovins reflète probablement une infection opportuniste par contact avec des fèces d'oiseaux et d'autres animaux à identifier en particulier pour le ST5. Il est aussi intéressant de noter que trois STs (ST1, ST2 et ST3) ont été trouvés en commun chez les vaches laitières et leurs éleveurs (**Article 2 Table 1**). En comparant les séquences correspondantes de ces isolats humains et

DISCUSSION

animaux, une identité de 100% a été démontrée pour un seul isolat de ST3 commun à ces deux hôtes. Comme on sait que le ST3 est largement prédominant dans la population humaine (Clark *et al.* 2013; Stensvold et Clark 2016), y compris au Liban, et qu'il est très rarement présent chez les bovins domestiques (**Article 2 Table 2**), ce cas d'infection du bétail par *Blastocystis* sp. ST3 peut probablement s'expliquer par une zoonose inverse c'est-à-dire un passage de l'Homme à l'animal comme cela a été suggéré dans des études antérieures pour différents autres groupes d'animaux (Ramírez *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014). En ce qui concerne les ST1 et ST2, leur origine dans le bétail domestique libanais reste incertaine selon nos données de séquence. Globalement, la faible prévalence des ST1, ST2, ST3, ST5 et ST7 observée dans la population bovine libanaise suggère que ces animaux ne sont probablement pas des hôtes naturels de ces STs et qu'ils sont potentiellement infectés de manière opportuniste par une exposition directe à des matières fécales provenant d'hôtes humains et non humains ou par l'ingestion d'eau potable ou d'aliments contaminés dans leur environnement comme cela a été proposé chez les chiens errants et les chiens domestiques (Osman *et al.* 2015; Wang *et al.* 2013). Cependant, comme les bovins domestiques sont porteurs de STs zoonotiques potentiels, ces animaux sont donc capables d'excréter les kystes correspondants et peuvent donc représenter des réservoirs zoonotiques secondaires d'infection.

Prévalence et distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans des camps de réfugiés syriens au Nord-Liban

Malgré un nombre croissant d'enquêtes épidémiologiques récentes visant à clarifier la diversité génétique des isolats de *Blastocystis* sp. à travers le monde, plusieurs régions géographiques restent encore peu explorées comme celles des pays du Moyen-Orient et de la péninsule arabique. En effet, les données actuellement disponibles concernent principalement le Liban comme nous avons pu en discuter dans mon étude précédente (El Safadi *et al.* 2013; Greige *et al.* 2018; Osman *et al.* 2016; Etude 2) ainsi que l'Iran (Alinaghizade *et al.* 2017; Moosavi *et al.* 2012) et l'Arabie Saoudite (Mohamed *et al.* 2017). A ma connaissance, aucune étude d'épidémiologie moléculaire n'a jamais été réalisée dans la population syrienne, en partie à cause de la crise humanitaire qui touche fortement ce pays depuis 2011. Cette crise a en outre engendré le déplacement d'un nombre considérable de réfugiés au Liban, pour la plupart syriens, augmentant ainsi la population locale de près de 30% (Ghanem 2016). La majorité de ces réfugiés risquent de contracter des infections parasitaires puisqu'ils se

DISCUSSION

retrouvent souvent dans des conditions d'extrême pauvreté et d'hygiène insuffisantes. Cela peut naturellement créer un environnement idéal pour le déclenchement d'épidémies parmi les réfugiés mais aussi au sein de la population libanaise. Le premier objectif de cette troisième enquête de ma thèse a donc été d'explorer la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population syrienne en menant une étude épidémiologique à grande échelle auprès des réfugiés syriens vivant dans des camps au Nord-Liban. En outre, comme les données moléculaires concernant l'épidémiologie de *Blastocystis* sp. étaient aussi disponibles pour la population libanaise vivant dans cette même région du Nord-Liban (voir Etude 2), mon second objectif a alors été de comparer les STs et génotypes identifiés dans la population syrienne et dans la population locale libanaise afin d'évaluer la circulation du parasite entre ces deux communautés.

Cette étude menée dans la population syrienne permet d'élargir nos connaissances sur l'épidémiologie de ce parasite dans une région du monde encore peu étudiée où certaines populations vivant dans cette zone géographique peuvent être considérées à risque d'infection en raison de conditions sanitaires précaires et d'un approvisionnement en eau potable déficient. En raison de la crise syrienne, la réalisation d'études de terrain en Syrie reste quasiment impossible, ce qui peut expliquer en partie le manque crucial de données épidémiologiques concernant les protozoaires parasites intestinaux dans ce pays. Pour palier à cette contrainte, nous avons choisi de nous intéresser à la population syrienne hébergée dans les camps du Nord-Liban. Un total de 306 échantillons ont ainsi été collectés chez des réfugiés syriens vivant dans 26 camps du Nord-Liban avec ou sans assainissement (**Article 3 Figure 1**) puis testés pour la présence de *Blastocystis* sp. Par PCR en temps réel, 63,7% d'entre eux se sont avérés positifs soulignant une large circulation du parasite dans ces camps. Cette prévalence élevée est proche de celle observées dans les pays du Moyen-Orient comme au Liban (55 à 63% selon la cohorte) (Greige *et al.* 2018; Osman *et al.* 2016; Etude 2) mais beaucoup plus importante que celles rapportées en Arabie Saoudite (10,5%) (Mohamed *et al.* 2017) et en Iran (6,5%) (Badparva *et al.* 2014). Elle est aussi du même ordre de grandeur que celles observées au Qatar (71,1%) (Abu-Madi *et al.* 2015) et aux Émirats arabes unis (EAU) (44,4%) (AbuOdeh *et al.* 2016). Cependant, ces deux dernières études ne reflètent pas la situation du parasite dans les populations locales puisque les cohortes analysées étaient uniquement composées de travailleurs migrants nouvellement arrivés au Qatar et aux EAU et originaires de pays d'Afrique, d'Asie de l'Est et de l'Ouest.

Au sein de l'ensemble de la cohorte syrienne, le sexe des participants n'a pas été identifié comme un facteur de risque potentiel associé à la colonisation par *Blastocystis* sp. ce

DISCUSSION

qui était aussi le cas dans les études conduites dans d'autres pays du Moyen-Orient (Abu-Madi *et al.* 2015; AbuOdeh *et al.* 2016; Osman *et al.* 2016). De même, l'âge n'était pas un facteur de risque significatif même si la prévalence de *Blastocystis* sp. était plus élevée dans la classe d'âge des plus de 30 ans ce qui pouvait s'expliquer par des réinfections fréquentes ou une colonisation à long terme chez ces adultes. Par contre, un facteur de risque significatif était le statut sanitaire des camps puisque la prévalence du parasite était plus importante dans l'ensemble des camps sans assainissement (70,5%) que dans l'ensemble des camps avec assainissement (59,2%) (**Article 3 Table 1**). Ce facteur de risque était attendu puisque directement en lien avec le péril fécal. C'est d'ailleurs dans les pays où les conditions sanitaires et d'hygiène sont les plus précaires que les prévalences du parasite sont les plus élevées que ce soit en Afrique (El Safadi *et al.* 2014; Etude 2), en Asie (Noradilah *et al.* 2017) ou en Amérique du Sud (Higuera *et al.* 2020). En outre, aucune association n'a pu être établie dans cette étude entre l'infection à *Blastocystis* sp. et la présence de symptômes digestifs comme décrit et discuté précédemment dans plusieurs revues (Clark *et al.* 2013; Tan 2008; Wawrzyniak *et al.* 2013). De même, aucun symptôme digestif n'est significativement corrélé à la présence de *Blastocystis* sp. chez ces réfugiés même si les douleurs abdominales représentent le trouble digestif le plus fréquent chez les participants colonisés par le parasite comme cela a été montré dans d'autres cohortes comme par exemple au Liban (Osman *et al.* 2016) et en France (El Safadi *et al.* 2016).

Parmi les échantillons de selles positifs pour *Blastocystis* sp. dans la présente enquête, 15,9 % d'entre eux représentaient des infections mixtes qui sont donc courantes chez les réfugiés syriens en lien avec une exposition probable des individus à différentes sources d'infection comme cela a aussi été suggéré dans mon étude conduite au Sénégal (**Article 1**). Dans l'analyse des 164 isolats positifs restants correspondant à des infections simples, le ST3 était le ST le plus fréquent suivi du ST1 et du ST2 (**Article 3 Table 1**). Comme nous l'avons détaillé tout le long de cette thèse, ST3 est de loin le ST le plus répandu dans la population humaine à travers le monde (Alfellani *et al.* 2013a; Clark *et al.* 2013; Stensvold et Clark 2016). C'est donc aussi le cas dans la population syrienne mais aussi au Liban (**Article 3 Table 2**) (El Safadi *et al.* 2013; Greige *et al.* 2018; Osman *et al.* 2016; Etude 2) ainsi que dans les pays voisins tels que l'Iran (Moosavi *et al.* 2012; Rezaei Riabi *et al.* 2018; Shirvani *et al.* 2020) et l'Arabie Saoudite (Mohamed *et al.* 2017). La seule différence dans la distribution des STs observée entre cohortes du Moyen-Orient est que le ST1 est le deuxième ST le plus courant après le ST3 chez les réfugiés syriens et en Arabie Saoudite, alors qu'il se situe à la troisième position parmi les isolats libanais sous-typés, mais toujours avec une fréquence

DISCUSSION

élevée. Étant donné que les ST1 à ST3 sont prédominants dans la population humaine et moins fréquemment identifiés chez les animaux (Cian *et al.* 2017; Hublin *et al.* 2020), cela suggère fortement que les infections par ces STs chez les réfugiés syriens sont principalement corrélées à une large transmission interhumaine comme c'est le cas supposé par exemple chez les écoliers sénégalais (**Article 1**). Il est aussi intéressant de noter que le ST4 est totalement absent chez les réfugiés syriens. Dans les pays du Moyen-Orient, un seul isolat de ST4 a été identifié au Liban (El Safadi *et al.* 2013) et pas plus de deux douzaines sur un total d'environ 700 isolats sous-typés en Iran (Khademvatan *et al.* 2017; Khoshnood *et al.* 2015; Piranshahi *et al.* 2018). Par ailleurs, Alfellani *et al.* (2013a) ont mis en avant la rareté voire même l'absence du ST4 dans les régions à population majoritairement musulmane comme dans la présente étude, émettant ainsi indirectement l'hypothèse d'un lien potentiel entre cette population et ses habitudes alimentaires ou son absence de contact avec certains animaux. Les raisons de l'absence de ST4 dans certaines régions du monde restent inconnues bien que, comme précisé précédemment (**Article 1**), une émergence récente du ST4 en Europe d'origine zoonotique a été proposée (Clark *et al.* 2013). Le dernier isolat sous-typé chez les réfugiés syriens appartient au ST10 et jusqu'à très récemment, ce ST n'avait encore jamais été documenté chez l'Homme alors qu'il représente le ST le plus largement répandu chez les bovins (Cian *et al.* 2017; Hublin *et al.* 2020; Article 2). Dans l'étude conduite dans cette thèse au Sénégal (**Article 1**), deux isolats de ST10 ont été identifiés. Le cas de ST10 chez un réfugié syrien s'ajoute donc à ces deux cas précédents suggérant pour chacun d'entre eux une transmission du bétail à l'Homme.

La distribution des STs de *Blastocystis* sp. est très similaire entre camps avec ou sans assainissement et aucune association significative n'a été démontrée entre le ST et le sexe ou l'âge des participants. De même, aucun ST n'a été trouvé comme étant significativement associé au statut symptomatique des réfugiés ou à des troubles digestifs tels que des douleurs abdominales ou des diarrhées. De nombreuses études moléculaires en particulier reprises dans les revues de Clark *et al.* (2013) et Tan (2008) ont cherché à établir un lien possible entre STs de *Blastocystis* sp. et symptômes. Les résultats obtenus étaient contradictoires d'une étude à l'autre et ce, pour deux raisons principales. La première est qu'il est quasiment impossible d'exclure pour chaque individu au sein d'une population toute autre cause identifiable (autres parasites intestinaux, bactéries ou virus) pouvant induire les mêmes symptômes digestifs que ceux décrits pour la blastocystose. La seconde est que le résultat clinique de l'infection par *Blastocystis* sp. pour un même isolat d'un individu à l'autre peut largement dépendre de l'immunité et de la composition du microbiote intestinal de l'hôte (Audebert *et al.* 2016) mais

DISCUSSION

aussi du ST/génotype et de la virulence du parasite (Ajjampur et Tan 2016). Par conséquent, les études de cas cliniques restent la principale source d'information pour analyser le lien potentiel entre le ST et la présence de symptômes (Fréalles *et al.* 2015).

Comme nous l'avons précédemment réalisé chez les écoliers sénégalais (**Article 1**), l'étape suivante de notre enquête a consisté à étudier la diversité intra-ST des trois principaux STs (ST1 à ST3) identifiés dans la cohorte de réfugiés syriens. Le nombre de génotypes mis en évidence est très limité avec seulement 5 génotypes de ST1, 3 de ST2 et 4 de ST3 soit un total de 12 génotypes (**Article 3 Figure 2**). Si on considère uniquement le nombre de génotypes, ST2 semble être le ST présentant la plus faible diversité intra-ST. Toutefois, cette affirmation est invalidée par l'analyse des rapports moyens isolats/génotypes qui a mis en évidence que le ST3 présentait la plus faible diversité intra-ST chez ces réfugiés suivi du ST2 et du ST1. Il est frappant de constater que la même approche a montré un schéma similaire de diversité intra-ST pour ST1 à ST3 parmi les isolats sénégalais (**Article 1**). Aucun des génotypes syriens appartenant aux ST1, ST2 ou ST3 n'a été trouvé plus fréquemment en fonction de l'âge ou du niveau d'assainissement des camps. De même, aucun génotype n'a été identifié comme étant associé de manière significative au statut symptomatique des réfugiés ou à la présence de douleurs abdominales ou de diarrhée.

Dans la cohorte syrienne, le nombre total de génotypes caractérisés (12) était en comparaison très nettement inférieur à celui déterminé au sein de la cohorte sénégalaise (43) (**Article 1 Figure 2**). Dans cette dernière cohorte, une proportion importante des génotypes n'englobe qu'un nombre limité d'isolats suggérant l'existence de multiples sources environnementales potentielles d'infection par le parasite en plus d'une transmission anthroponotique. Au sein de la cohorte syrienne, la transmission interhumaine est sans nul doute très largement prédominante expliquant ainsi le faible nombre de génotypes trouvés dans cette population. Cela peut en particulier s'expliquer par le nombre relativement faible d'enfants inscrits dans les écoles libanaises (environ 25%), qui de plus fréquentent l'école à des heures différentes de celles des écoliers libanais, limitant ainsi les contacts entre ces deux populations. D'autre part, très peu de réfugiés syriens adultes (15%) ont une activité professionnelle en dehors des camps. Ces deux observations peuvent donc favoriser la transmission interhumaine du parasite parmi les réfugiés dans ces hébergements provisoires.

En comparant les génotypes de *Blastocystis* sp. identifiés chez les réfugiés syriens et dans la population libanaise du Nord-Liban, il est frappant de constater que seuls 16,6 % des 277 isolats de ST1 à ST3 libanais (**Article 3 Table 2**) peuvent être classés parmi les 12 génotypes syriens. En outre, les génotypes syriens ST1-4, ST3-4 et surtout le ST3-1 qui

DISCUSSION

représente environ 90% des isolats de ST3 n'ont pas été identifiés dans la population libanaise. Sur cette base, nous avons proposé que la circulation du parasite entre la population locale et les réfugiés était assez limitée en raison de contacts restreints. Ainsi le ST3-1 syrien a été significativement plus fréquemment identifié chez les femmes que chez les hommes. Les femmes ayant moins d'activités en extérieur, elles restent donc plus longtemps dans les camps pendant la journée. De ce fait, la transmission interhumaine est facilitée et perpétue sans doute la surreprésentation de ce génotype ST3-1. De plus, la promiscuité dans certains camps faciliterait évidemment une telle transmission. En revanche, le génotype ST1-5, qui ne représente qu'environ 30 % des isolats syriens de ST1 est surreprésenté chez les hommes. Comme ce génotype a également été signalé dans la population libanaise, on peut donc proposer que les hommes syriens colonisés par le ST1-5 ont été contaminés par une source extérieure à la suite de leur participation à des activités en dehors des camps. Une autre hypothèse sous-jacente qui peut être testée dans le cadre de futures études épidémiologiques est d'analyser la circulation de ce génotype dans les différents pays du Moyen-Orient et de la péninsule arabique.

Conclusion

CONCLUSION

Les différentes enquêtes toutes valorisées dans ma thèse apportent une contribution significative à notre connaissance de l'épidémiologie et de la transmission de *Blastocystis* sp. dans les populations humaine et animale. En effet, j'ai d'abord pu conduire la plus large étude jamais réalisée en Afrique et sous-typer un très grand nombre d'isolats Sénégalais. Les données obtenues ont d'abord montré une prévalence extrêmement élevée du parasite dans une large cohorte d'écoliers puisque celle-ci dépassait les 80%. Cette forte prévalence est très probablement liée à une circulation active et généralisée du parasite en raison à la fois des conditions sanitaires et d'hygiène précaires au sein de cette population et de l'exposition de ces individus à diverses sources environnementales contaminées. L'analyse de la diversité génétique intra-ST des trois principaux STs identifiés dans cette étude montre que le ST3 est principalement transmis par la voie anthroponotique, alors que plusieurs autres sources d'infection existent pour les ST1 et ST2 en plus d'une transmission inter-humaine. Il a également été démontré que les isolats considérés comme étant d'origine animale (ST7, ST10 et ST14) sont en nombre assez limité au Sénégal, ce qui souligne le faible risque de transmission zoonotique dans ce pays tout comme d'ailleurs plus globalement en Afrique. Cette enquête de terrain à grande échelle permet ainsi de fournir des informations précieuses aux autorités sanitaires locales afin de mettre en place des mesures urgentes de prévention (analyse de la qualité de l'eau et éducation des villageois concernant les modes de transmission des parasites intestinaux par exemple) et de contrôle afin de réduire de manière significative l'impact de *Blastocystis* sp. Cela peut aussi passer par le développement de méthodes moléculaires de détection du parasite dans ce pays. En effet, les méthodes dites morphologiques ne sont pas assez sensibles et doivent être supplantées par des approches moléculaires. Cela peut être mis en place à l'hôpital de Saint-Louis au Sénégal en sachant que la partie sous-typage qui est de loin la plus coûteuse peut rester optionnelle dans une optique de dépistage.

J'ai aussi dans le cadre de ma thèse obtenu les premières données d'épidémiologie moléculaire concernant *Blastocystis* sp. dans la filière des vaches laitières au Liban qui est d'un intérêt économique majeur dans ce pays. La prévalence rapportée dépasse les 60% ce qui pose naturellement la question de l'impact de cette infection chez ces animaux. Une grande variété de STs colonisant ces vaches ont été identifiés (ST1, ST2, ST3, ST5, ST7, ST10 et ST14). Parmi eux et du fait de leur prédominance, j'ai pu confirmer que les ST10 et ST14 représentaient bien les STs adaptés aux bovins. Les autres STs sont minoritaires et leur présence est vraisemblablement liée à une contamination opportuniste provenant de diverses sources animales, humaines et/ou environnementales. En parallèle, j'ai pu dans cette étude et

CONCLUSION

pour la première fois chez les bovins, comparer la distribution des STs du parasite chez ces animaux avec celle observée chez les éleveurs. Cette comparaison a mis en évidence un risque de transmission zoonotique de *Blastocystis* sp. *a priori* très limité. Toutefois, d'autres études à grande échelle devront être menées pour comprendre pleinement le rôle exact des bovins domestiques dans l'épidémiologie de *Blastocystis* sp. en particulier comme sources potentielles de transmission du parasite à l'Homme, tout au moins en tant que réservoirs secondaires via le portage et la libération de STs minoritaires dans l'environnement.

La dernière enquête de ma thèse est tout à fait unique sous deux aspects. Le premier est d'avoir pu fournir les premières données épidémiologiques sur la prévalence et la distribution des STs et des génotypes de *Blastocystis* sp. dans la population syrienne hébergée dans des camps dans la région du Nord-Liban ce qui donne une vue plus complète de la charge parasitaire dans les pays du Moyen-Orient. La prévalence de 60% observée dans cette étude met en évidence une circulation active du parasite dans cette population. De plus, le manque d'assainissement dans certains camps est clairement un facteur de risque d'infection favorisant la transmission de *Blastocystis* sp. Le second aspect tout à fait original de cette enquête est d'avoir réalisé une analyse comparative des STs et génotypes identifiés chez les réfugiés syriens avec ceux préalablement rapportés dans la population locale du Nord-Liban. Cette comparaison nous a d'abord permis de démontrer que la transmission de *Blastocystis* sp. au sein des réfugiés est principalement anthroponotique et que la circulation du parasite entre les réfugiés et la population locale libanaise est limitée pour cause de contacts restreints entre ces deux communautés. Des programmes de dépistage des protozoaires intestinaux ainsi que la mise en œuvre de mesures de prévention et de contrôle de la qualité de l'eau couplée à la mise en place d'installations sanitaires sont donc nécessaires au sein de plusieurs de ces camps afin d'améliorer l'état de santé des réfugiés et prévenir la propagation de parasites entre les réfugiés et la population locale.

Plus globalement, mes travaux ont montré l'intérêt et l'utilité de poursuivre ces enquêtes d'épidémiologie moléculaire que ce soit chez l'Homme comme chez l'animal pour clarifier la diversité génétique et la transmission de ce parasite. Plusieurs régions du globe restent cependant encore trop peu étudiées et en particulier l'Afrique mais aussi l'Asie. Mon équipe d'accueil en France apporte sans cesse sa contribution afin de palier à ce manque de données puisqu'elle participe actuellement à de larges études en Guinée (collaboration avec le Dr T. Guilavogui, financement en cours demandé au CNRS) et au Vietnam (collaboration avec le Dr L. Nguyen, projet financé par l'Ambassade de France au Vietnam). Il est évident

CONCLUSION

que ces nouvelles données permettront de compléter encore un peu plus notre panorama d'ensemble de la circulation de *Blastocystis* sp. à travers le monde.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdulsalam, A. M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H. M., Al-Mekhlafi, A. M., Ahmed, A. and Surin, J. 2013. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. *PLoS ONE*, **8**, 12, e84372.
- Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y. and Yoshikawa, H. 2002. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary Parasitology*, **106**, 3, 203–12.
- Abu-Madi, M., Aly, M., Behnke, J. M., Clark, C. G. and Balkhy, H. 2015. The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasites & Vectors*, **8**, 1, 465.
- AbuOdeh, R., Ezzedine, S., Samie, A., Stensvold, C. R. and ElBakri, A. 2016. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infection, Genetics and Evolution*, **37**, 158–62.
- Adamu, H., Wegayehu, T. and Petros, B. 2013. High prevalence of diarrhoeagenic intestinal parasite infections among Non-ART HIV patients in Fitcha Hospital, Ethiopia. *PLoS ONE*, **8**, 8.
- Ahmed, M. M., Habib, F. S. M., Saad, G. A. and El Naggar, H. M. 2019. Surface ultrastructure, protein profile and zymography of *Blastocystis* species isolated from patients with colorectal carcinoma. *Journal of Parasitic Diseases*, **43**, 2, 294–303.
- 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**, 8, e0160458.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ajjampur, S. S. R. and Tan, K. S. W. 2016. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitology International*, **65**, 6 Pt B, 772–79.
- Al Nahhas, S. and Aboualchamat, G. 2020. Investigation of parasitic contamination of salad vegetables sold by street vendors in city markets in Damascus, Syria. *Food and Waterborne Parasitology*, **21**, e00090.
- Alemu, A., Shiferaw, Y., Getnet, G., Yalew, A. and Addis, Z. 2011. Opportunistic and other intestinal parasites among HIV/AIDS patients attending Gambi higher clinic in Bahir Dar city, North West Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **4**, 8, 661–65.
- Alfellani, M. A., Jacob, A. S., Perea, N. O., Krecek, R. C., Taner-Mulla, D., Verweij, J. J., Levecke, B., Tannich, E., Clark, C. G. and Stensvold, C. R. 2013b. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology*, **140**, 8, 966–71.
- Alfellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S. U., Fagbenro-Beyioku, A. F. and Clark, C. G. 2013a. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica*, **126**, 1, 11–18.
- Alfellani, M. A., Taner-Mulla, D., Jacob, A. S., Imeede, C. A., Yoshikawa, H., Stensvold, C. R. and Clark, C. G. 2013c. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*, **164**, 4, 497–509.
- Alinaghizade, A., Mirjalali, H., Mohebali, M., Stensvold, C. R. and Rezaeian, M. 2017. Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, **50**, 77–82.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Megrin, W. A. I. 2010. Intestinal parasites infection among immunocompromised patients in Riyadh, Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **13**, 8, 390–94.
- Alzate, J. F., Toro-Londoño, M., Cabarcas, F., Garcia-Montoya, G. and Galvan-Diaz, A. 2020. Contrasting microbiota profiles observed in children carrying either *Blastocystis* spp. or the commensal amoebas *Entamoeba coli* or *Endolimax nana*. *Scientific Reports*, **10**, 1, 15354.
- Andersen, L. O., Bonde, I., Nielsen, H. B. and Stensvold, C. R. 2015. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiology Ecology*, **91**, 7.
- Angelici, M. C., Nardis, C., Scarpelli, R. and Ade, P. 2018. *Blastocystis hominis* transmission by non-potable water: a case report in Italy. *The New Microbiologica*, **41**, 2, 173–77.
- Anuar, T. S., Ghani, M. K. A., Azreen, S. N., Salleh, F. M. and Moktar, N. 2013. Blastocystis infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites & Vectors*, **6**, 1, 40.
- Arisue, N., Hashimoto, T. and Yoshikawa, H. 2003. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology*, **126**, Pt 1, 1–9.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borrueil, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Bork, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 7346, 174–80.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Asghari, A., Sadraei, J., Pirestani, M. and Mohammadpour, I. 2019. First molecular identification and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolated from hooded crows (*Corvus cornix*) and pigeons (*Columba livia*) in Tehran Province, Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **62**, 25–30.
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., 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. *Scientific Reports*, **6**, 1, 25255.
- Badparva, E., Sadraee, J. and Kheirandish, F. 2015. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in khorramabad, iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **8**, 3, e14810.
- Badparva, E., Sadraee, J., Kheirandish, F. and Frouzandeh, M. 2014. Genetic diversity of human *Blastocystis* isolates in Khorramabad, Central Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, **9**, 1, 44–49.
- Bahrami, F., Babaei, E., Badirzadeh, A., Riabi, T. R. and Abdoli, A. 2020. *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **39**, 6, 1027–42.
- Baldursson, S. and Karanis, P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research*, **45**, 20, 6603–14.
- Bálint, A., Dóczy, I., Bereczki, L., Gyulai, R., Szűcs, M., Farkas, K., Urbán, E., Nagy, F., Szepes, Z., Wittmann, T. and Molnár, T. 2014. Do not forget the stool examination!—cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitology Research*, **113**, 4, 1585–90.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Banaticla, J. E. G. and Rivera, W. L. 2011. Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. *Journal of Water and Health*, **9**, 1, 128–37.
- Barazesh, A., Fouladvand, M., Tahmasebi, R., Heydari, A. and Fallahi, J. 2015. The prevalence of intestinal parasites in hemodialysis patients in Bushehr, Iran. *Hemodialysis International*, **19**, 3, 447–51.
- Barbosa, C. V., Barreto, M. M., Andrade, R. de J., Sodr e, F., d’Avila-Levy, C. M., Peralta, J. M., Igreja, R. P., de Macedo, H. W. and Santos, H. L. C. 2018. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. *PloS One*, **13**, 3, e0193860.
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E. M. S., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C. J. A., van Vugt, M., Goorhuis, A. and van Gool, T. 2013. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infectious Diseases*, **13**, 389.
- Basyoni, M. M. A., Fouad, S. A., Amer, M. F., Amer, A. F. and Ismail, D. I. 2018. Atorvastatin: *In-Vivo* Synergy with Metronidazole as Anti-*Blastocystis* Therapy. *The Korean Journal of Parasitology*, **56**, 2, 105.
- Batista, L., P erez Jove, J., Rosinach, M., Gonzalo, V., Sainz, E., Loras, C., Forn e, M., Esteve, M. and Fern andez-Ba ares, F. 2017. Low efficacy of metronidazole in the eradication of *Blastocystis hominis* in symptomatic patients: Case series and systematic literature review. *Gastroenterolog a y Hepatolog a (English Edition)*, **40**, 6, 381–87.
- Bednarska, M., Jankowska, I., Pawelas, A., Piwczyńska, K., Bajer, A., Wolska-Ku sni erz, B., Wielopolska, M. and Welc-Fal eciak, R. 2018. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Blastocystis*,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

and other opportunistic infections in patients with primary and acquired immunodeficiency. *Parasitology Research*, **117**, 9, 2869–79.

Beghini, F., Pasolli, E., Truong, T. D., Putignani, L., Cacciò, S. M. and Segata, N. 2017. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *The International Society for Microbial Ecology*, **11**, 12, 2848–63.

Belova, L. M. and Kostenko, L. A. 1990. *Blastocystis galli* sp. n. (Protista: Rhizopoda) from the intestines of domestic hens. *Parazitologiya*, **24**, 2, 164–68.

Ben Abda, I., Maatoug, N., Ben Romdhane, R., Bouhelmi, N., Zallegua, N., Aoun, K., Viscogliosi, E. and Bouratbine, A. 2017. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis Area, Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**, 1, 202–4.

Böhm-Gloning, B., Knobloch, J. and Walderich, B. 1997. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Tropical Medicine & International Health*, **2**, 8, 771–78.

Boondit, J., Pipatsatitpong, D., Mungthin, M., Taamasri, P., Tan-ariya, P., Naaglor, T. and Leelayoova, S. 2014. Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in orphans at the Babies' Home, Nonthaburi Province, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, **97**, S52-59.

Boorom, K. F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.-H., Zhou, X.-N., Ok, Ü. Z., Leelayoova, S. and Jones, M. S. 2008. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*, **1**, 1, 40.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boreham, P. F. and Stenzel, D. J. 1993. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Advances in Parasitology*, **32**, 1–70.
- Bradbury, R. S., Barbé, B., Jacobs, J., Jallow, A. T., Camara, K. C., Colley, M., Wegmüller, R., Jasey, B., Cham, Y., Baldeh, I. and Prentice, A. 2015. Enteric pathogens of food sellers in rural Gambia with incidental finding of *Myxobolus* species (Protozoa: Myxozoa). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **109**, 5, 334–39.
- Brumpt, E. 1912. *Blastocystis hominis* n .sp. et formes voisines. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **5**, 725–30.
- Calderón de la Barca, A. M., Castillo-Fimbres, R. S., Mejía-León, M. E., Quihui-Cota, L., Ochoa-Leyva, A. and Aguayo-Patrón, S. V. 2020. Enteric parasitic infection disturbs bacterial structure in Mexican children with autoantibodies for type 1 diabetes and/or celiac disease. *Gut Pathogens*, **12**, 1, 37.
- Cañete, R., Díaz, M. M., García, R. A., Martínez, P. M. L. and Ponce, F. M. 2012. Intestinal parasites in children from a day care centre in Matanzas City, Cuba. *PLoS ONE*, **7**, 12, e51394.
- Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S., Bracaglia, G., Normanno, G., Putignani, L. and Giangaspero, A. 2017. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiology*, **67**, 67–75.
- Carbajal, J. A., Castillo, L. D., Lanuza, M. D., Villar, J. and Borrás, R. 1997. Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. *International Journal for Parasitology*, **27**, 8, 941–45.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Castañeda, S., Muñoz, M., Villamizar, X., Hernández, P. C., Vásquez, L. R., Tito, R. Y. and Ramírez, J. D. 2020. Microbiota characterization in *Blastocystis*-colonized and *Blastocystis*-free school-age children from Colombia. *Parasites & Vectors*, **13**, 1, 521.
- Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, **73**, 3, 203–66.
- Chai, Y., Deng, L., Liu, H., Yao, J., Zhong, Z., Fu, H., Shen, L., Zhou, Z., Deng, J., Hu, Y. and Peng, G. 2020. First subtyping of *Blastocystis* sp. from pet rodents in southwestern China. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **11**, 143–48.
- Chandramathi, S., Suresh, K., Anita, Z. B. and Kuppusamy, U. R. 2012. Infections of *Blastocystis hominis* and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **106**, 4, 267–69.
- Chandrasekaran, H., Govind, S. K., Panchadcharam, C., Bathmanaban, P., Raman, K. and Thergarajan, G. 2014. High lipid storage in vacuolar forms of subtype 6 *Blastocystis* sp. in ostrich. *Parasites & Vectors*, **7**, 469.
- Chapman, S., Thompson, C., Wilcox, A. and Russell, K. 2009. What is your diagnosis? Rectal scraping from a dog with diarrhea. *Veterinary Clinical Pathology*, **38**, 1, 59–62.
- 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*. *Parasitology Research*, **83**, 4, 313–18.
- 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), 151–60.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L.-L., Monchy, S., Noël, C., Poirier, P., Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Bosc, S., Chabé, M., Petit, T., Certad, G. and Viscogliosi, E. 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE*, **12**, 1, e0169659.
- Cian, A., El Safadi, D., Nourrisson, C., Fréalle, E., Dutoit, E., Wawrzyniak, I., Gantois, N., Delbac, F., Chabé, M., Certad, G., Poirier, P., Viscogliosi, E. 2016. *Blastocystis*, un protozoaire entérique émergent. *Feuillets de Biologie* **331**: 55-68
- Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A. and Stensvold, C. R. 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in Parasitology*, **82**, 1–32.
- Coyle, C. M., Varughese, J., Weiss, L. M. and Tanowitz, H. B. 2012. *Blastocystis*: To Treat or Not to Treat... *Clinical Infectious Diseases*, **54**, 1, 105–10.
- Cruz Licea, V., Plancarte Crespo, A., Morán Alvarez, C., Valencia Rojas, S., Rodríguez Sánchez, G. and Vega Franco, L. 2003. *Blastocystis hominis* among food vendors in Xochimilco markets. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **45**, 1–2, 12–15.
- Dacal, E., Saugar, J. M., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., Robinson, E., Köster, P. C., Aznar-Ruiz-de-Alegría, M. L., Espasa, M., Ninda, A., Gandasegui, J., Sulleiro, E., Moreno, M., Salvador, F., Molina, I., Rodríguez, E. and Carmena, D. 2018. Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasites & Vectors*, **11**, 1, 67.
- D'Alfonso, R., Santoro, M., Essi, D., Monsia, A., Kaboré, Y., Glé, C., Di Cave, D., Sorge, R. P., Di Cristanziano, V. and Berrilli, F. 2017. *Blastocystis* in Côte d'Ivoire: molecular

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

identification and epidemiological data. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **36**, 11, 2243–50.

David, É. B., Guimarães, S., de Oliveira, A. P., Goulart de Oliveira-Sequeira, T. C., Nogueira Bittencourt, G., Moraes Nardi, A. R., Martins Ribolla, P. E., Bueno Franco, R. M., Branco, N., Tosini, F., Bella, A., Pozio, E. and Cacciò, S. M. 2015. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*, **8**, 1, 103.

Defaye, M., Nourrisson, C., Baudu, E., Lashermes, A., Meynier, M., Meleine, M., Wawrzyniak, I., Bonnin, V., Barbier, J., Chassaing, B., Godfraind, C., Gelot, A., Barnich, N., Ardid, D., Bonnet, M., Delbac, F., Carvalho, F. A. and Poirier, P. 2020. Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically *Blastocystis*-infected rats. *Scientific Reports*, **10**, 1, 1–12.

Defaye, M., Nourrisson, C., Baudu, E., Warwzyniak, I., Bonnin, V., Bonnet, M., Barnich, N., Ardid, D., Delbac, F., Carvalho, F. A. and Poirier, P. 2018. Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp. *PLoS ONE*, **13**, 11, e0207669.

Deng, L., Chai, Y., Zhou, Z., Liu, H., Zhong, Z., Hu, Y., Fu, H., Yue, C. and Peng, G. 2019. Epidemiology of *Blastocystis* sp. infection in China: a systematic review. *Parasite*, **26**.

Deng, Y., Zhang, S., Ning, C., Zhou, Y., Teng, X., Wu, X., Chu, Y., Yu, Y., Chen, J., Tian, L. and Wang, W. 2020. Molecular Epidemiology and Risk Factors of *Blastocystis* sp. Infections Among General Populations in Yunnan Province, Southwestern China. *Risk Management and Healthcare Policy*, **13**, 1791–1801.

Denoëud, F., Roussel, M., Noël, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., Segurens, B., Anthouard, V., Texier, C.,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blot, N., Poirier, P., Ng, G. C., Tan, K. S. W., Artiguenave, F., Jaillon, O., Aury, J.-M., Delbac, F., Wincker, P., Vivarès, C. P. and El Alaoui, H. 2011. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biology*, **12**, 3, R29.
- Dinleyici, E. C., Eren, M., Dogan, N., Reyhanioglu, S., Yargic, Z. A. and Vandenplas, Y. 2011. Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* or metronidazole in symptomatic children with *Blastocystis hominis* infection. *Parasitology Research*, **108**, 3, 541–45.
- Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., Kustimur, S. and Altinbas, A. 2010. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS ONE*, **5**, 11.
- El Deeb, H. K. and Khodeer, S. 2013. *Blastocystis* spp.: frequency and subtype distribution in iron deficiency anemic versus non-anemic subjects from Egypt. *Journal of Parasitology*, **99**, 4, 599–602.
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A.-P., Botterel, F., Candolfi, E., Desoubieux, G., Lachaud, L., Morio, F., Pomares, C., Rabodonirina, M., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Gantois, N., Certad, G., Delhaes, L., Poirier, P. and Viscogliosi, E. 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infectious Diseases*, **16**, 1, 451.
- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G. and Viscogliosi, E. 2014. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases*, **14**, 164.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- El Safadi, D., Meloni, D., Poirier, P., Osman, M., Cian, A., Gaayeb, L., Wawrzyniak, I., Delbac, F., El Alaoui, H., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Mallat, H., Dabboussi, F., Hamze, M. and Viscogliosi, E. 2013. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**, 6, 1203–6.
- Eroglu, F. and Koltas, I. S. 2010. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitology Research*, **107**, 4, 841–45.
- Esteghamati, A., Khanaliha, K., Bokharaei-Salim, F., Sayyahfar, S. and Ghaderipour, M. 2019. Prevalence of intestinal parasitic infection in cancer, organ transplant and primary immunodeficiency patients in Tehran, Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **20**, 2, 495–501.
- Fayer, R., Elsasser, T., Gould, R., Solano, G., Urban, J. and Santin, M. 2014. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research*, **113**, 4, 1465–72.
- Fayer, R., Santin, M. and Macarasin, D. 2012. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitology Research*, **111**, 3, 1349–55.
- Fontanelli Sulekova, L., Gabrielli, S., Furzi, F., Milardi, G. L., Biliotti, E., De Angelis, M., Iaiani, G., Fimiani, C., Maiorano, M., Mattiucci, S. and Taliani, G. 2019. Molecular characterization of *Blastocystis* subtypes in HIV-positive patients and evaluation of risk factors for colonization. *BMC Infectious Diseases*, **19**, 1, 876.
- Forsell, J., Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Johansson, A., Evengård, B. and Granlund, M. 2017. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiology*, **17**, 1, 231.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H. and Evengård, B. 2016. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1–3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites & Vectors*, **9**, 1, 370.
- Fouad, S. A., Basyoni, M. M. A., Fahmy, R. A. and Kobaisi, M. H. 2011. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab Journal of Gastroenterology*, **12**, 4, 194–200.
- Fréalles, E., Safadi, D. E., Cian, A., Aubry, E., Certad, G., Osman, M., Wacrenier, A., Dutoit, E., Creusy, C., Dubos, F. and Viscogliosi, E. 2015. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerging Infectious Diseases*, **21**, 1, 91.
- Gabrielli, S., Furzi, F., Fontanelli Sulekova, L., Taliani, G. and Mattiucci, S. 2020. Occurrence of *Blastocystis*-subtypes in patients from Italy revealed association of ST3 with a healthy gut microbiota. *Parasite Epidemiology and Control*, **9**, e00134.
- Gantois, N., Lamot, A., Seesao, Y., Creusy, C., Li, L.-L., Monchy, S., Benamrouz-Vanneste, S., Karpouzopoulos, J., Bourgain, J.-L., Rault, C., Demaret, F., Baydoun, M., Chabé, M., Fréalles, E., Aliouat-Denis, C.-M., Gay, M., Certad, G. and Viscogliosi, E. 2020. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in edible marine fish and marine mammals: A large scale-study conducted in atlantic northeast and on the coasts of Northern France. *Microorganisms*, **8**, 3, 460.
- 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., Hilliou, F., Klute, M. J., Suga, H., Malik, S.-B., Pightling, A. W., Kolisko, M., Rachubinski, R. A., Schlacht, A., Soanes, D. M., Tsaousis, A. D., Archibald, J. M., Ball, S. G., Dacks, J. B., Clark, C. G., Giezen, M. van der and Roger, A.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

J. 2017. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biology*, **15**, 9, e2003769.

Ghanem, N. Local Governance under Pressure: Research on Social Stability in T5 Area, North Lebanon. Menapolis and OXFAM Italia. 2016. Available online: <https://reliefweb.int/report/lebanon/local-governance-under-pressure-research-social-stability-t5-area-north-lebanon> (accessed on 7 March 2016).

Gil, G. S., Chaudhari, S., Shady, A., Caballes, A. and Hong, J. 2016. *Blastocystis* sp. infection mimicking Clostridium Difficile Colitis G. Walder. *Case Reports in Infectious Diseases*, **2016**, 7264387.

Goe, A. M., Heard, D. J., Easley, J. R., Weeden, A. L., Childress, A. L. and Wellehan, J. F. X. 2016. *Blastocystis* sp. and *Blastocystis ratti* in a Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*) with diarrhea. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **47**, 2, 640–44.

Greige, S., El Safadi, D., Bécu, N., Gantois, N., Pereira, B., Chabé, M., Benamrouz-Vanneste, S., Certad, G., El Hage, R., Chemaly, M., Hamze, M. and Viscogliosi, E. 2018. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites & Vectors*, **11**, 1, 389.

Greigert, V., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Nourrisson, C., Pfaff, A. W., Benarbia, L., Pereira, B., Randrianariveolosia, M., Razafindrakoto, J.-L., Solotiana Rakotomalala, R., Morel, E., Candolfi, E. and Poirier, P. 2018. Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PloS One*, **13**, 10, e0204576.

Guglielmetti, P., Cellesi, C., Figura, N. and Rossolini, A. 1989. Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. *Lancet*, **2**, 8676, 1394.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hamad, I., Abdallah, R. A., Ravaux, 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**, 1, e0191913.
- Hameed, D. M. A., Hassanin, O. M. and Zuel-Fakkar, N. M. 2011. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research*, **108**, 3, 553–60.
- Han, J. Q., Li, Z., Zou, Y., Pu, L. H., Zhu, X. Q., Zou, F. C. and Huang, C.-Q. 2020. Prevalence, molecular characterization and risk factors of *Blastocystis* sp. from farmed pigs in Yunnan Province, Southwestern China. *Acta Parasitologica*, **65**, 4, 1005–10.
- Han, T.-H., Park, S.-H., Chung, J.-Y., Jeong, H.-W., Jung, J., Lee, J.-I., Hwang, Y.-O., Kim, I.-Y., Lee, J.-H. and Jung, K. 2018. Detection of pathogenic viruses in the ambient air in Seoul, Korea. *Food and Environmental Virology*, **10**, 3, 327–32.
- Haresh, K., Suresh, K., Anuar, A. K. and Saminathan, S. 1999. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Tropical Medicine & International Health*, **4**, 4, 274–77.
- Helenbrook, W. D., Shields, W. M. and Whipps, C. M. 2015. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitology Research*, **114**, 7, 2517–25.
- van Hellemond, J. J., Molhoek, N., Wismans, P. J., van Genderen, P. J. J. and Koelewijn, R. 2013. Is paromomycin the drug of choice for eradication of *Blastocystis* in adults? *Journal of Infection and Chemotherapy*, **19**, 3, 545–48.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Higuera, A., Villamizar, X., Herrera, G., Giraldo, J. C., Vasquez-A, L. R., Urbano, P., Villalobos, O., Tovar, C. and Ramírez, J. D. 2020. Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ*, **8**, e8554.
- Hisao, Y. and Ayako, H. 1996. Freeze-fracture cytochemistry of membrane cholesterol in *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology*, **26**, 10, 1111–14.
- Hoevers, J., Holman, P., Logan, K., Hommel, M., Ashford, R. and Snowden, K. 2000. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. *Parasitology Research*, **86**, 1, 57–61.
- Hublin, J. S. Y., Maloney, J. G. and Santin, M. 2020. *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Research in Veterinary Science*. S0034-5288(20)31032-8.
- 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. *Parasitology Research*, **102**, 5, 853–60.
- Iebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Pantanella, F., Monsia, A., Di Cristanziano, V., Di Cave, D., Schippa, S., Berrilli, F. and D'Alfonso, R. 2016. Gut microbiota related to *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp. and *Blastocystis hominis* infections in humans from Côte d'Ivoire. *Journal of Infection in Developing Countries*, **10**, 9, 1035–41.
- 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. *Parasitology International*, **56**, 2, 107–12.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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. *Parasitology Research*, **105**, 1, 135–40.
- Ilchyshyn, N. P. and Monti, P. 2019. Extra-enteric *Blastocystis* infection in a duck. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **31**, 3, 382–84.
- Jadallah, K. A., Nimri, L. F. and Ghanem, R. A. 2017. Protozoan parasites in irritable bowel syndrome: A case-control study. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, **8**, 4, 201–7.
- Jalallou, N., Iravani, S., Rezaeian, M., Alinaghizade, A. and Mirjalali, H. 2017. Subtypes distribution and frequency of *Blastocystis* sp. isolated from diarrheic and non-diarrheic patients. *Iranian Journal of Parasitology*, **12**, 1, 63–68.
- Janarthanan, S., Khoury, N. and Antaki, F. 2011. An unusual case of invasive *Blastocystis* hominis infection. *Endoscopy*, **43**, S 02, E185–86.
- Javanmard, E., Rahimi, H. M., Niyayati, M., Aghdaei, H. A., Sharifdini, M., Mirjalali, H., Zali, M. R. and Karanis, P. 2019. Molecular analysis of *Blastocystis* sp. and its subtypes from treated wastewater routinely used for irrigation of vegetable farmlands in Iran. *Journal of Water and Health*, **17**, 5, 837–44.
- Jiménez, P. A., Jaimes, J. E. and Ramírez, J. D. 2019. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasites & Vectors*, **12**, 1, 376.
- Kaczmarek, A., Gołąb, E., Żarnowska-Prymek, H., Rawska, A., Jańczak, D., Lewicki, A., Wesołowska, M., Rozej-Bielicka, W., Cielecka, D. and Sałamatin, R. 2017. Genetic diversity

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland. *Przegląd Epidemiologiczny*, **71**, 4, 539–46.

Kalousová, B., Piel, A. K., Pomajbíková, K., Modrý, D., Stewart, F. A. and Petrželková, K. J. 2014. Gastrointestinal Parasites of Savanna Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Ugalla, Tanzania. *International Journal of Primatology*, **35**, 2, 463–75.

Karadag, G., Tamer, G. S. and Dervisoglu, E. 2013. Investigation of intestinal parasites in dialysis patients. *Saudi Medical Journal*, **34**, 7, 714–18.

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 Dermato-Venereologica*, **88**, 1, 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. and Syafruddin, D. 2018. Molecular phylogeny of *Blastocystis* isolates from wild rodents captured in Indonesia and Japan. *Parasitology Research*, **117**, 9, 2841–46.

Kesuma, Y., Firmansyah, A., Bardosono, S., Sari, I. P. and Kurniawan, A. 2019. *Blastocystis* ST-1 is associated with Irritable Bowel Syndrome-diarrhoea (IBS-D) in Indonesian adolescences. *Parasite Epidemiology and Control*, **6**, e00112.

Khademvatan, S., Masjedizadeh, R., Rahim, F., Mahbodfar, H., Salehi, R., Yousefi-Razin, E. and Foroutan, M. 2017. *Blastocystis* and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitology International*, **66**, 2, 142–45.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khalifa, A. M., El Temsahy, M. M. and Abou El Naga, I. F. 2001. Effect of ozone on the viability of some protozoa in drinking water. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **31**, 2, 603–16.
- Khorshidvand, Z., Khazaei, S., Amiri, M., Taherkhani, H. and Mirzaei, A. 2020. Worldwide prevalence of emerging parasite *Blastocystis* in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, **152**, 104615.
- Khoshnood, S., Rafiei, A., Saki, J. and Alizadeh, K. 2015. Prevalence and genotype characterization of *Blastocystis hominis* among the baghmalek people in Southwestern Iran in 2013 - 2014. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **8**, 10.
- Kim, K.-T., Noh, G., Lee, H., Kim, S.-H., Jeong, H., Kim, Y., Jheong, W.-H., Oem, J.-K., Kim, T.-H., Kwon, O.-D. and Kwak, D. 2020. Genetic diversity and zoonotic potential of *Blastocystis* in Korean water deer, *hydropotes inermis argyropus*. *Pathogens*, **9**, 11.
- Kodio, A., Coulibaly, D., Koné, A. K., Konaté, S., Doumbo, S., Guindo, A., Bittar, F., Gouriet, F., Raoult, D., Thera, M. A. and Ranque, S. 2019. *Blastocystis* colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy Malian children. *Microorganisms*, **7**, 12.
- Kolkhir, P., Balakirski, G., Merk, H. F., Olisova, O. and Maurer, M. 2016. Chronic spontaneous urticaria and internal parasites – a systematic review. *Allergy*, **71**, 3, 308–22.
- Koltas, I. S., Akyar, I., Elgun, G. and Kocagoz, T. 2014. Feconomics®; a new and more convenient method, the routine diagnosis of intestinal parasitic infections. *Parasitology Research*, **113**, 7, 2503–8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kostka, M., Uzlikova, M., Cepicka, I. and Flegr, J. 2008. SlowFaster, a user-friendly program for slow-fast analysis and its application on phylogeny of *Blastocystis*. *BMC Bioinformatics*, **9**, 1, 341.
- 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**, 8, e0183097.
- Kumarasamy, V., Roslani, A. C., Rani, K. U. and Kumar Govind, S. 2014. Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasites & Vectors*, **7**, 1, 162.
- 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. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**, 9, 892–98.
- Kurt, Ö., Doğruman Al, F. and Tanyüksel, M. 2016. Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? *Parasitology International*, **65**, 6 Pt B, 797–801.
- Lappan, R., Classon, C., Kumar, S., Singh, O. P., Almeida, R. V. de, Chakravarty, J., Kumari, P., Kansal, S., Sundar, S. and Blackwell, J. M. 2019. Meta-taxonomic analysis of prokaryotic and eukaryotic gut flora in stool samples from visceral leishmaniasis cases and endemic controls in Bihar State India. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **13**, 9, e0007444.
- Leder, K. S., Hellard, M. E., Sinclair, M. I., Fairley, C. K. and Wolfe, R. S. J. 2005. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **20**, 9, 1390–94.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lee, H., Lee, S.-H., Seo, M.-G., Kim, H.-Y., Kim, J. W., Lee, Y.-R., Kim, J. H., Kwon, O.-D. and Kwak, D. 2018. Occurrence and genetic diversity of *Blastocystis* in Korean cattle. *Veterinary Parasitology*, **258**, 70–73.
- Lee, I. L., Tan, T. C., Tan, P. C., Nanthiney, D. R., Biraj, M. K., Surendra, K. M. and Suresh, K. G. 2012a. Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal. *Parasitology Research*, **110**, 4, 1553–62.
- Lee, L. I., Chye, T. T., Karmacharya, B. M. and Govind, S. K. 2012b. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites & Vectors*, **5**, 1, 130.
- Lee, M. G. and Stenzel, D. J. 1999. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitology Research*, **85**, 2, 109–17.
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P. and Mungthin, M. 2008. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**, 3, 401–6.
- Leelayoova, S., Taamasri, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Thathaisong, U. and Mungthin, M. 2002. *In-vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **96**, 8, 803–7.
- 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? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **36**, 9, 1531–40.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lepczyńska, M., Chen, W.-C. and Dzika, E. 2016. Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.? *International Journal of Dermatology*, **55**, 3, 259–66.
- Lhotská, Z., Jirků, M., Hložková, O., Brožová, K., Jirsová, D., Stensvold, C. R., Kolísko, M. and Jirků Pomajbíková, K. 2020. A Study on the prevalence and subtype diversity of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a gut-healthy human population in the Czech Republic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**.
- Li, L. H., Zhang, X. P., Lv, S., Zhang, L., Yoshikawa, H., Wu, Z., Steinmann, P., Utzinger, J., Tong, X. M., Chen, S. H. and Zhou, X. N. 2007a. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitology Research*, **102**, 1, 83–90.
- Li, L.-H., Zhou, X.-N., Du, Z.-W., Wang, X.-Z., Wang, L.-B., Jiang, J.-Y., Yoshikawa, H., Steinmann, P., Utzinger, J., Wu, Z., Chen, J.-X., Chen, S.-H. and Zhang, L. 2007b. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitology International*, **56**, 4, 281–86.
- 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. *Infection and Immunity*, **82**, 11, 4789–4801.
- Lintong, P. M., Sambuaga, M. K. and Tambajong, E. H. 2012. Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **2**, S965–68.
- Lokmer, A., Cian, A., Froment, A., Gantois, N., Viscogliosi, E., Chabé, M. and Ségurel, L. 2019. Use of shotgun metagenomics for the identification of protozoa in the gut microbiota of

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

healthy individuals from worldwide populations with various industrialization levels. *PLoS ONE*, **14**, 2, e0211139.

Long, H., Handschack, A., König, W. and Ambrosch, A. 2001. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology Research*, **87**, 12, 1029–30.

Ma, L., Qiao, H., Wang, H., Li, S., Zhai, P., Huang, J. and Guo, Y. 2020. Molecular prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. in primates in northern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, **67**, 6, 2789–96.

Maas, L., Dorigo-Zetsma, J. W., de Groot, C. J., Bouter, S., Plötz, F. B. and van Ewijk, B. E. 2014. Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**, 6, 545–50.

Malheiros, A. F., Stensvold, C. R., Clark, C. G., Braga, G. B. and Shaw, J. J. 2011. Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**, 6, 1050–53.

Maloney, J. G., Lombard, J. E., Urie, N. J., Shivley, C. B. and Santin, M. 2019. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research*, **118**, 2, 575–82.

Maloney, J. G., Molokin, A., da Cunha, M. J. R., Cury, M. C. and Santin, M. 2020. *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiology and Control*, **9**, e00138.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Martínez-Ocaña, J., Maravilla, P., Olivo-Díaz, A., Martínez-Ocaña, J., Maravilla, P. and Olivo-Díaz, A. 2020. Interaction between human mucins and parasite glycoproteins: the role of lectins and glycosidases in colonization by intestinal protozoa. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **62**, e64.
- Masuda, A., Sumiyoshi, T., Ohtaki, T. and Matsumoto, J. 2018. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. *Parasitology International*, **67**, 6, 702–5.
- McClure, H. M., Strobert, E. A. and Healy, G. R. 1980. *Blastocystis hominis* in a pig-tailed macaque: a potential enteric pathogen for nonhuman primates. *Laboratory Animal Science*, **30**, 5, 890–94.
- Mejia, R., Seco-Hidalgo, V., Garcia-Ramon, D., Calderón, E., Lopez, A. and Cooper, P. J. 2020. Detection of enteric parasite DNA in household and bed dust samples: potential for infection transmission. *Parasites & Vectors*, **13**, 1, 141.
- Meloni, D., Poirier, P., Mantini, C., Noël, C., Gantois, N., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Chabé, M., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Fiori, P. L., El Alaoui, H. and Viscogliosi, E. 2012. Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitology International*, **61**, 4, 719–22.
- Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S. and Bittar, F. 2019. A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiology & Infection*, **147**, e100.
- Michel, R., Sondaz, D., Philip, J. M., Calvet, F. and Daoud, W. 2011. Drainage basin of the the Senegal River, sanitary conditions in 2010. Part I: Illnesses directly linked to the water. *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial*, **71**, 2, 123–28.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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. *Infection and Immunity*, **79**, 12, 5019–26.
- 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. *Cellular Microbiology*, **14**, 9, 1474–84.
- 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. *Parasitology Research*, **82**, 5, 439–44.
- Moghaddam, Davood. D., Ghadirian, E. and Azami, M. 2005. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitology Research*, **96**, 4, 273–75.
- 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. *Infectious Agents and Cancer*, **12**, 1, 21.
- Mohamed, R. T., El-Bali, M. A., Mohamed, A. A., Abdel-Fatah, M. A., El-Malky, M. A., Mowafy, N. M., Zaghlool, D. A., Bakri, R. A. and Al-Harthi, S. A. 2017. Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasites & Vectors*, **10**, 1, 174.
- Moosavi, A., Haghghi, A., Mojarad, E. N., Zayeri, F., Alebouyeh, M., Khazan, H., Kazemi, B. and Zali, M. R. 2012. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitology Research*, **111**, 6, 2311–15.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Muadica, A. S., Köster, P. C., Dashti, A., Bailo, B., Hernández-de-Mingo, M., Reh, L., Balasegaram, S., Verlander, N. Q., Ruiz Chércoles, E. and Carmena, D. 2020. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms*, **8**, 4, 466.
- Nagel, R., Cuttell, L., Stensvold, C. R., Mills, P. C., Bielefeldt-Ohmann, H. and Traub, R. J. 2012. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Internal Medicine Journal*, **42**, 11, 1187–95.
- 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., Jin, M., Walter, J., Torres, J., Arrieta, M. C., Ximénez-García, C. and Finlay, B. B. 2018. Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. *MSystems*, **3**, 3.
- Nigro, L., Larocca, L., Massarelli, L., Patamia, I., Minniti, S., Palermo, F. and Cacopardo, B. 2003. A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. *Journal of Travel Medicine*, **10**, 2, 128–30.
- Ning, C.-Q., Hu, Z., Chen, J., Ai, L. and Tian, L.-G. 2020. Epidemiology of *Blastocystis* infection from 1990 to 2019 in China. *Infectious Diseases of Poverty*, **9**, 1, 168.
- Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.-C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M. L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L. and Viscogliosi, E. 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 1, 348–55.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Noël, C., Peyronnet, C., Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Delgado-Viscogliosi, P., Sogin, M. L., Capron, M., Viscogliosi, E. and Zenner, L. 2003. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **126**, 1, 119–23.
- Noor Azian, M. Y., San, Y. M., Gan, C. C., Yusri, M. Y., Nurulsyamzawaty, Y., Zuhaizam, A. H., Maslawaty, M. N., Norparina, I. and Vythilingam, I. 2007. Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **24**, 1, 55–62.
- Noradilah, S. A., Lee, I. L., Anuar, T. S., Salleh, F. M., Abdul Manap, S. N. A., Mohd Mohtar, N. S. H., Azrul, S. M., Abdullah, W. O. and Moktar, N. 2016. Occurrence of *Blastocystis* sp. in water catchments at Malay villages and Aboriginal settlement during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. *PeerJ*, **4**, e2541.
- Noradilah, S. A., Moktar, N., Anuar, T. S., Lee, I. L., Salleh, F. M., Manap, S. N. A. A., Mohtar, N. S. H. M., Azrul, S. M., Abdullah, W. O., Nordin, A. and Abdullah, S. R. 2017. Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasites & Vectors*, **10**, 1, 360.
- Nourrisson, C., Scanzi, J., Pereira, B., NkoudMongo, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Viscogliosi, E., Livrelli, V., Delbac, F., Dapoiny, M. and Poirier, P. 2014. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PloS One*, **9**, 11, e111868.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Omrani, V. F., Fallahi, Sh., Rostami, A., Siyadatpanah, A., Barzgapour, Gh., Mehravar, S., Memari, F., Hajjaliani, F. and Joneidi, Z. 2015. Prevalence of intestinal parasite infections and associated clinical symptoms among patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Infection*, **43**, 5, 537–44.
- Osman, M., Bories, J., El Safadi, D., Poirel, M.-T., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delhaes, L., Hugonnard, M., Certad, G., Zenner, L. and Viscogliosi, E. 2015. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Veterinary Parasitology*, **214**, 1, 167–70.
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandrainibe, R., Pinon, A., Lambert, C., Wawrzyniak, I., Dabboussi, F., Delbac, F., Favennec, L., Hamze, M., Viscogliosi, E. and Certad, G. 2016. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **10**, 3, e0004496.
- Paboriboune, P., Phoumindr, N., Borel, E., Sourinphoumy, K., Phaxayaseng, S., Luangkhot, E., Sengphilom, B., Vansilalom, Y., Odermatt, P., Delaporte, E., Etard, J.-F. and Rabodonirina, M. 2014. Intestinal parasitic infections in HIV-infected patients, Lao People's Democratic Republic. *PLoS ONE*, **9**, 3, e91452.
- Padukone, S., Mandal, J. and Parija, S. C. 2017. Severe *Blastocystis* subtype 3 infection in a patient with colorectal cancer. *Tropical Parasitology*, **7**, 2, 122–24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Paik, S., Jung, B. Y., Lee, H., Hwang, M.-H., Han, J. E., Rhee, M. H., Kim, T.-H., Kwon, O.-D. and Kwak, D. 2019. Molecular detection and subtyping of *Blastocystis* in Korean Pigs. *The Korean Journal of Parasitology*, **57**, 5, 525–29.
- Parija, S. C. and Jeremiah, S. 2013. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, **3**, 1, 17–25.
- 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**, Pt 3, 359–67.
- Parkar, U., Traub, R. J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B. and Thompson, R. C. A. 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, **169**, 1–2, 8–17.
- 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. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **57**, 6, 467–72.
- Perea, M., Vásquez, V., Pineda, V., Samudio, F., Calzada, J. E. and Saldaña, A. 2020. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. infecting children from a rural community in Panama. *Parasite Epidemiology and Control*, **9**, e00139.
- Pipatsatitpong, D., Rangsin, R., Leelayoova, S., Naaglor, T. and Mungthin, M. 2012. Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in an orphanage in Bangkok, Thailand. *Parasites & Vectors*, **5**, 37.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Piranshahi, A. R., Tavalla, M. and Khademvatan, S. 2018. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* isolates in patients with HIV-positive using locus SSU-rDNA. *Journal of Parasitic Diseases*, **42**, 1, 28–33.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 3, 975–83.
- 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 Pathogens*, **8**, 3, e1002545.
- Popruk, S., Udonsom, R., Koompapong, K., Mahittikorn, A., Kusolsuk, T., Ruangsittichai, J. and Palasuwan, A. 2015. Subtype distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar border, Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, **53**, 1, 13–19.
- Poulsen, C. S., Efunshile, A. M., Nelson, J. A. and Stensvold, C. R. 2016. Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **95**, 1, 175–79.
- 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. *Eukaryotic Cell*, **7**, 3, 435–43.
- 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. *Infection and Immunity*, **74**, 7, 4114–23.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J. and Tan, K. S. W. 2005. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*, **97**, 5, 386–89.
- Qi, M., Wei, Z., Zhang, Y., Zhang, Q., Li, J., Zhang, L. and Wang, R. 2020. Genetic diversity of *Blastocystis* in kindergarten children in southern Xinjiang, China. *Parasites & Vectors*, **13**, 1, 15.
- Quilez, J., Clavel, A., Sanchez-Acedo, C. and Causape, A. C. 1995. Detection of *Blastocystis* sp. in pigs in Aragon (Spain). *Veterinary Parasitology*, **56**, 4, 345–48.
- Rajamanikam, A., Hooi, H. S., Kudva, M., Samudi, C. and Kumar, S. 2019. Resistance towards metronidazole in *Blastocystis* sp.: A pathogenic consequence. *PloS One*, **14**, 2, e0212542.
- Rajamanikam, A., Kumar, S., Samudi, C. and Kudva, M. 2018. Exacerbated symptoms in *Blastocystis* sp.-infected patients treated with metronidazole: two case studies. *Parasitology Research*, **117**, 8, 2585–90.
- 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**, 2, e0172586.
- 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., Vicuña, Y., Mongi, F. and Casero, R. D. 2016. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, **41**, 32–35.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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. *Infection, Genetics and Evolution*, **22**, 223–28.

Rezaei Riabi, T., Mirjalali, H., Haghghi, A., Rostami Nejad, M., Pourhoseingholi, M. A., Poirier, P., Delbac, F., Wawrzyniak, I. and Zali, M. R. 2018. Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. *Infection, Genetics and Evolution*, **61**, 119–26.

Rivero-Juarez, A., Dashti, A., López-López, P., Muadica, A. S., Risalde, M. de L. A., Köster, P. C., Machuca, I., Bailo, B., de Mingo, M. H., Dacal, E., García-Bocanegra, I., Saugar, J. M., Calero-Bernal, R., González-Barrio, D., Rivero, A., Briz, V. and Carmena, D. 2020. Protist enteroparasites in wild boar (*Sus scrofa ferus*) and black Iberian pig (*Sus scrofa domesticus*) in southern Spain: a protective effect on hepatitis E acquisition? *Parasites & Vectors*, **13**, 1, 281.

Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J. and Stark, D. 2011. Comparison of Microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **84**, 2, 308–12.

Roberts, T., Bush, S., Ellis, J., Harkness, J. and Stark, D. 2015. In Vitro antimicrobial susceptibility patterns of *Blastocystis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**, 8, 4417–23.

Roberts, T., Stark, D., Harkness, J. and Ellis, J. 2013. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **32**, 3, 335–43.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J. and Ellis, J. 2014. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, **6**, 1, 17.
- Rodrigues, A. C., Silva, M. D. C. da, Pereira, R. Â. S. and Pinto, L. C. 2020. Prevalence of contamination by intestinal parasites in vegetables (*Lactuca sativa* L. and *Coriandrum sativum* L.) sold in markets in Belém, northern Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **100**, 7, 2859–65.
- Rojas-Velázquez, L., Maloney, J. G., Molokin, A., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., González, E., Pérez-Juárez, H., Ximénez, C. and Santin, M. 2019. Use of next-generation amplicon sequencing to study *Blastocystis* genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasites & Vectors*, **12**, 1, 566.
- Roshan, N., Clancy, A., Gunaratne, A. W., LeBusque, A., Pilarinos, D. and Borody, T. J. 2020. Two-day enema antibiotic therapy for parasite eradication and resolution of symptoms. *World Journal of Gastroenterology*, **26**, 26, 3792.
- Rossignol, J., Kabil, S. M., Said, M., Samir, H. and Younis, A. M. 2005. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **3**, 10, 987–91.
- Rostami, A., Riahi, S. M., Haghghi, A., Saber, V., Armon, B. and Seyyedtabaei, S. J. 2017. The role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology Research*, **116**, 9, 2361–71.
- Ruau, C. G. and Stang, B. V. 2014. Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PloS One*, **9**, 9, e107496.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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. *Experimental Parasitology*, **191**, 55–61.
- Salehi, R., Haghighi, A., Stensvold, C. R., Kheirandish, F., Azargashb, E., Raeghi, S., Kohansal, C. and Bahrami, F. 2017. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* isolated from humans in Ahvaz, Southwestern Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, **10**, 3, 235–41.
- Salim, H. R., Kumar, G. S., Vellayan, S., Mak, J. W., Anuar, A. K., Init, I., Vennila, G. D., Saminathan, R. and Ramakrishnan, K. 1999. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitology Research*, **85**, 12, 1032–33.
- 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. *Parasites & Vectors*, **9**, 1, 548.
- Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, Á., Restrepo, C., Ruíz, M., Reyes, P., Qian, Y., Xiao, L., López, M. C. and Ramírez, J. D. 2017. Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon Basin. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 248.
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G. and Fayer, R. 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research*, **109**, 1, 205–12.
- Santos, H. J. and Rivera, W. L. 2013. Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **6**, 10, 780–84.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Scanlan, P. D. 2012. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends in Parasitology*, **28**, 8, 327–34.
- Scanlan, P. D., Hill, C. J., Ross, R. P., Ryan, C. A., Stanton, C. and Cotter, P. D. 2018. The intestinal protist *Blastocystis* is not a common member of the healthy infant gut microbiota in a Westernized country (Ireland). *Parasitology*, **145**, 10, 1274–78.
- Scanlan, P. D., Knight, R., Song, S. J., Ackermann, G. and Cotter, P. D. 2016. Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infection Genetics and Evolution*, **45**, 95–97.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 12, 4071–76.
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G., De Vos, W. M., O'Toole, P. W. and Cotter, P. D. 2014. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, **90**, 1, 326–30.
- Scicluna, S. M., Tawari, B. and Clark, C. G. 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, **157**, 1, 77–85.
- Shariati, A., Fallah, F., Pormohammad, A., Taghipour, A., Safari, H., Chirani, A. salami, Sabour, S., Alizadeh-Sani, M. and Azimi, T. 2019. The possible role of bacteria, viruses, and parasites in initiation and exacerbation of irritable bowel syndrome. *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 6, 8550–69.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shirvani, G., Fasihi-Harandi, M., Raiesi, O., Bazargan, N., Zahedi, M. J., Sharifi, I., Kalantari-Khandani, B., Nooshadokht, M., Shabandoust, H., Mohammadi, M. A., Ebrahimipour, M. and Babaei, Z. 2020. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from patients with irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and chronic urticaria in Iran. *Acta Parasitologica*, **65**, 1, 90–96.
- Silberman, J. D., Sogin, M. L., Leipe, D. D. and Clark, C. G. 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*, **380**, 6573, 398.
- Silva, M. do R. A., Melo, G. B., Malta, F. M., Abdala, E., Costa, S. F., Pierrotti, L. C., Gonçalves, E. M. N., Castilho, V. L. P., Chieffi, P. P., Gryscek, R. C. B. and Paula, F. M. 2020. Subtypes of *Blastocystis* sp. isolated in fecal samples from transplant candidates in São Paulo, Brazil. *Parasite Epidemiology and Control*, **8**, e00128.
- Silva-Díaz, H., Flores-Esqueche, L., Llatas-Cancino, D., Guevara Vásquez, G. and Silva-García, T. 2016. Frequency and *in vitro* susceptibility antiparasitic of *Blastocystis hominis* from patients admitted to the Hospital Regional Lambayeque, Peru. *Revista De Gastroenterologia Del Peru: Organo Oficial De La Sociedad De Gastroenterologia Del Peru*, **36**, 3, 197–202.
- Singh, M., Ho, L. C., Yap, A. L. L., Ng, G. C., Tan, S. W., Moe, K. T. and Yap, E. H. 1996. Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitology Research*, **82**, 2, 165–69.
- Sinniah, B., Sabaridah, I., Soe, M. M., Sabitha, P., Awang, I. P. R., Ong, G. P. and Hassan, A. K. R. 2012. Determining the prevalence of intestinal parasites in three Orang Asli (Aborigines) communities in Perak, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **29**, 2, 200–206.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ślódkiewicz-Kowalska, A., Majewska, A. C., Rzymiski, P., Skrzypczak, Ł. and Werner, A. 2015. Human waterborne protozoan parasites in freshwater bivalves (*Anodonta anatina* and *Unio tumidus*) as potential indicators of fecal pollution in urban reservoir. *Limnologica*, **51**, 32–36.
- Song, J.-K., Yin, Y.-L., Yuan, Y.-J., Tang, H., Ren, G.-J., Zhang, H.-J., Li, Z.-X., Zhang, Y.-M. and Zhao, G.-H. 2017. First genotyping of *Blastocystis* sp. in dairy, meat, and cashmere goats in northwestern China. *Acta Tropica*, **176**, 277–82.
- Souppart, L., Moussa, H., Cian, A., Sancier, G., Poirier, P., El Alaoui, H., Delbac, F., Boorom, K., Delhaes, L., Dei-Cas, E. and Viscogliosi, E. 2010. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitology Research*, **106**, 2, 505–11.
- Speich, B., Marti, H., Ame, S. M., Ali, S. M., Bogoch, I. I., Utzinger, J., Albonico, M. and Keiser, J. 2013. Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide and albendazole-nitazoxanide. *Parasites & Vectors*, **6**, 1, 3.
- Srichaipon, N., Nuchprayoon, S., Charuchaibovorn, S., Sukkapan, P. and Sanprasert, V. 2019. A simple genotyping method for rapid differentiation of *Blastocystis* subtypes and subtype distribution of *Blastocystis* spp. in Thailand. *Pathogens*, **8**, 1.
- Stensvold, C. R. 2013. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology*, **3**, 1, 26–34.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 6, 1847–51.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Jespersgaard, C., Mølbak, K. and Nielsen, H. V. 2007b. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **59**, 3, 303–7.
- Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Nielsen, H. V., Bada, A. and Thorsen, S. 2008. Symptomatic infection with *Blastocystis* sp. subtype 8 successfully treated with trimethoprim–sulfamethoxazole. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **102**, 3, 271–74.
- Stensvold, C. R. and Clark, C. G. 2016. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitology International*, **65**, 6, 763–71.
- Stensvold, C. R. and Clark, C. G. 2020. Pre-empting pandora’s box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends in Parasitology*, **36**, 3, 229–32.
- Stensvold, C. R., Lebbad, M., Hansen, A., Beser, J., Belkessa, S., O’Brien Andersen, L. and Clark, C. G. 2020. Differentiation of *Blastocystis* and parasitic archamoebids encountered in untreated wastewater samples by amplicon-based next-generation sequencing. *Parasite Epidemiology and Control*, **9**, e00131.
- 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. *Epidemiology and Infection*, **137**, 11, 1655–63.
- 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? *Journal of Clinical Gastroenterology*, **44**, 2, 85–90.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S. W., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H. and Clark, C. G. 2007a. Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. *Trends in Parasitology*, **23**, 3, 93–96.
- Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V. and Arendrup, M. C. 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *The Journal of Parasitology*, **92**, 5, 1081–87.
- Stenzel, D. J. and Boreham, P. F. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, **9**, 4, 563–84.
- Stenzel, D. J. and Boreham, P. F. L. 1991. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology*, **21**, 5, 613–15.
- 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*. *Parasitology Research*, **79**, 6, 456–60.
- Suresh, K. and Smith, H. 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **23**, 6, 509–11.
- Suresh, K., Smith, H. V. and Tan, T. C. 2005. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 9, 5619–20.
- Suresh, K., Venilla, G. D., Tan, T. C. and Rohela, M. 2009. *In vivo* encystation of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, **104**, 6, 1373–80.
- Suwanti, L. T., Susana, Y., Hastutiek, P., Suprihati, E. and Lastuti, N. D. R. 2020. *Blastocystis* spp. subtype 10 infected beef cattle in Kamal and Socah, Bangkalan, Madura, Indonesia. *Veterinary World*, **13**, 2, 231–37.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Taghipour, A., Olfatifar, M., Rostami, A., Foroutan, M., Vasigala, V. and Norouzi, M. 2020. Intestinal parasites in hemodialysis patients from developing countries: A systematic review and meta-analysis. *Hemodialysis International*, **24**, 1, 12–21.
- Tai, W.-P., Hu, P.-J., Wu, J. and Lin, X.-C. 2011. Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in China. *Parasitology Research*, **108**, 5, 1207–10.
- Tan, K. S. W. 2004. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, **126**, 1–2, 121–44.
- Tan, K. S. W. 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**, 4, 639–65.
- 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. *Current Infectious Disease Reports*, **12**, 1, 28–35.
- Tan, T. C. and Suresh, K. G. 2006. Amoeboid form of *Blastocystis hominis*—a detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research*, **99**, 6, 737–42.
- Tan, T. C., Suresh, K. G., Thong, K. L. and Smith, H. V. 2006. PCR fingerprinting of *Blastocystis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts. *Parasitology Research*, **99**, 4, 459–65.
- Tan, T. C., Tan, P. C., Sharma, R., Sugnaseelan, S. and Suresh, K. G. 2013. Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitology Research*, **112**, 1, 85–89.
- Teow, W. L., Zaman, V., Ng, G. C., Chan, Y. C., Yap, E. H., Howe, J., Gopalakrishnakone, P. and Singh, M. 1991. A *Blastocystis* species from the sea-snake, *Lapemis hardwickii* (Serpentes: Hydrophiidae). *International Journal for Parasitology*, **21**, 6, 723–26.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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. *Parasitology Research*, **93**, 6, 445–47.
- Thanikachalam, M. P., Kasemsuk, Y., Mak, J. W., Sharifah Emilia, T. S. and Kandasamy, P. 2008. A study of parasitic infections in the luminal contents and tissue sections of appendix specimens. *Tropical Biomedicine*, **25**, 2, 166–72.
- Thathaisong, U., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Pipatsatitpong, D., Tan-ariya, P., Naaglor, T. and Leelayoova, S. 2013. Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**, 2, 352–58.
- Tian, L.-G., Chen, J.-X., Wang, T.-P., Cheng, G.-J., Steinmann, P., Wang, F.-F., Cai, Y.-C., Yin, X.-M., Guo, J., Zhou, L. and Zhou, X.-N. 2012. Co-infection of HIV and intestinal parasites in rural area of China. *Parasites & Vectors*, **5**, 1, 36.
- Tian, L.-G., Wang, T.-P., Lv, S., Wang, F.-F., Guo, J., Yin, X.-M., Cai, Y.-C., Dickey, M. K., Steinmann, P. and Chen, J.-X. 2013. HIV and intestinal parasite co-infections among a Chinese population: an immunological profile. *Infectious Diseases of Poverty*, **2**, 1, 18.
- Tito, R. Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S., Falony, G., Hildebrand, F., Darzi, Y., Rymenans, L., Verspecht, C., Bork, P., Vermeire, S., Joossens, M. and Raes, J. 2019. Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, **68**, 7, 1180–89.
- Toychiev, A., Abdujapparov, S., Imamov, A., Navruzov, B., Davis, N., Badalova, N. and Osipova, S. 2018. Intestinal helminths and protozoan infections in patients with colorectal

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

cancer: prevalence and possible association with cancer pathogenesis. *Parasitology Research*, **117**, 12, 3715–23.

Toychiev, A., Navruzov, B., Pazylova, D., Davis, N., Badalova, N. and Osipova, S. 2021. Intestinal protozoa and helminths in ulcerative colitis and the influence of anti-parasitic therapy on the course of the disease. *Acta Tropica*, **213**, 105755.

Udonsom, R., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Pintong, A., Sukthana, Y. and Popruk, S. 2018. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, **65**, 107–11.

Villamizar, X., Higuera, A., Herrera, G., Vasquez-A, L. R., Buitron, L., Muñoz, L. M., Gonzalez-C, F. E., Lopez, M. C., Giraldo, J. C. and Ramírez, J. D. 2019. Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, **19**, 1, 190.

Villar, J., Carbajal, J. A., Lanuza, M. D., Muñoz, C. and Borrás, R. 1998. *In vitro* encystation of *Blastocystis hominis*: a kinetics and cytochemistry study. *Parasitology Research*, **84**, 1, 54–58.

Vogelberg, C., Stensvold, C. R., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Gräfe, U. and Pöhlmann, C. 2010. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitology International*, **59**, 3, 469–71.

Wang, J., Gong, B., Yang, F., Zhang, W., Zheng, Y. and Liu, A. 2018. Subtype distribution and genetic characterizations of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infection, Genetics and Evolution*, **57**, 171–76.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wang, W., Cuttell, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Inpankaew, T., Owen, H. and Traub, R. J. 2013. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasites & Vectors*, **6**, 1, 215.
- Wang, W., Owen, H., Traub, R. J., Cuttell, L., Inpankaew, T. and Bielefeldt-Ohmann, H. 2014. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Veterinary Parasitology*, **203**, 3–4, 264–69.
- Wawrzyniak, I., Courtine, D., Osman, M., Hubans-Pierlot, C., Cian, A., Nourrisson, C., Chabe, M., Poirier, P., Bart, A., Polonais, V., Delgado-Viscogliosi, P., El Alaoui, H., Belkorchia, A., van Gool, T., Tan, K. S. W., Ferreira, S., Viscogliosi, E. and Delbac, F. 2015. Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genomics Data*, **4**, 22–23.
- 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. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, **1**, 5, 167-78.
- 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. *Parasitology International*, **61**, 3, 437–42.
- Wong, K. H. S., Ng, G. C., Lin, R. T. P., Yoshikawa, H., Taylor, M. B. and Tan, K. S. W. 2008. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research*, **102**, 4, 663–70.
- Wu, B., Yin, J., Texier, C., Roussel, M. and Tan, K. S.-W. 2010. *Blastocystis* legumain is localized on the cell surface, and specific inhibition of its activity implicates a pro-survival role for the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 3, 1790–98.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wu, G., Yishu, X., Gaolu, C., Guangming, L.M.L., Jinglin, Z. (2000) Investigation of an epidemic outbreak of blastocystiasis. *Chinese Journal of Parasitic Disease Control*, **13**: 25-27.
- 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 Neglected Tropical Diseases*, **8**, 5, e2885.
- 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 Research International*, **2014**, 209163.
- Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Islam, M. and Asim Beg, M. 2004. *In vitro* susceptibility of *Blastocystis hominis* isolated from patients with irritable bowel syndrome. *British Journal of Biomedical Science*, **61**, 2, 75–77.
- Yan, Y., Su, S., Ye, J., Lai, X., Lai, R., Liao, H., Chen, G., Zhang, R., Hou, Z. and Luo, X. 2007. *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitology Research*, **101**, 6, 1527–32.
- Yason, J. A., Ajjampur, S. S. R. and Tan, K. S. W. 2016. *Blastocystis* isolate B exhibits multiple modes of resistance against antimicrobial peptide LL-37. *Infection and Immunity*, **84**, 8, 2220–32.
- Yason, J. A., Koh, K. A. R. P. and Tan, K. S. W. 2018. Viability screen of LOPAC1280 reveals phosphorylation inhibitor auranofin as a potent inhibitor of *Blastocystis* Subtype 1, 4, and 7 Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**, 8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y. and Tan, K. S. W. 2019. Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: *in vitro* and *in vivo* studies. *Microbiome*, **7**, 1, 30.
- 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. *Parasitology International*, **65**, 6 Pt B, 792–96.
- Yilmaz, E. A., Karaatmaca, B., Sackesen, C., Sahiner, U. M., Cavkaytar, O., Sekerel, B. E. and Soyer, O. 2016. Parasitic infections in children with chronic spontaneous urticaria. *International Archives of Allergy and Immunology*, **171**, 2, 130–35.
- Yoshikawa, H., Abe, N., Iwasawa, M., Kitano, S., Nagano, I., Wu, Z. and Takahashi, Y. 2000. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 4, 1324–30.
- Yoshikawa, H. and Hayakawa, A. 1996. Morphological changes in the central vacuole of *Blastocystis hominis* during *in vitro* culture. *Protoplasma*, **194**, 1, 63–68.
- Yoshikawa, H. and Iwamasa, A. 2016. Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitology International*, **65**, 6, Part B, 785–91.
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E. H., Singh, M. and Takahashi, Y. 1998. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and Cellular Probes*, **12**, 3, 153–59.
- Yoshikawa, H., Satoh, J. and Enose, Y. 1995. Light and electron microscopic localization of lipids in *Blastocystis hominis*. *Journal of Electron Microscopy*, **44**, 2, 100–103.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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. *Parasitology International*, **65**, 6 Pt B, 780–84.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Howe, J., Hashimoto, T., Geok-Choo, N. and Tan, K. S. W. 2007. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54**, 1, 33–37.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I. K. M. D., Hossain, M. B., Zaman, V., Haque, R. and Takahashi, Y. 2004b. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research*, **92**, 1, 22–29.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Nagano, I. and Takahashi, Y. 2003. Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *The Journal of Parasitology*, **89**, 3, 585–94.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Pandey, K., Pandey, B. D., Sherchand, J. B., Yanagi, T. and Kanbara, H. 2009. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Veterinary Parasitology*, **160**, 3–4, 295–300.
- Yowang, A., Tsaousis, A. D., Chumphonsuk, T., Thongsin, N., Kullawong, N., Popluechai, S. and Gentekaki, E. 2018. High diversity of *Blastocystis* subtypes isolated from asymptomatic adults living in Chiang Rai, Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, **65**, 270–75.
- Zahedi, A., Greay, T. L., Papparini, A., Linge, K. L., Joll, C. A. and Ryan, U. M. 2019. Identification of eukaryotic microorganisms with 18S rRNA next-generation sequencing in

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

wastewater treatment plants, with a more targeted NGS approach required for *Cryptosporidium* detection. *Water Research*, **158**, 301–12.

Zaki, M., Zaman, V. and Sheikh, N. A. 1996. Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to chlorine. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, **46**, 8, 178–79.

Zanetti, A. dos S., Malheiros, A. F., de Matos, T. A., Longhi, F. G., Moreira, L. M., Silva, S. L., Castrillon, S. K. I., Ferreira, S. M. B., Ignotti, E. and Espinosa, O. A. 2020. Prevalence of *Blastocystis* sp. infection in several hosts in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, **13**, 1, 30.

Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Epis, S. and Manfredi, M. T. 2016. Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitology Research*, **115**, 1, 307–12.

Zhang, S.-X., Kang, F.-Y., Chen, J.-X., Tian, L.-G. and Geng, L.-L. 2019. Risk factors for *Blastocystis* infection in HIV/AIDS patients with highly active antiretroviral therapy in Southwest China. *Infectious Diseases of Poverty*, **8**, 1, 89.

Zhu, W., Tao, W., Gong, B., Yang, H., Li, Y., Song, M., Lu, Y. and Li, W. 2017. First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. *Veterinary Parasitology*, **246**, 38–42.

Zierdt, C. H. 1991. *Blastocystis hominis*--past and future. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**, 1, 61–79.

Zierdt, C. H., Rude, W. S. and Bull, B. S. 1967. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *American Journal of Clinical Pathology*, **48**, 5, 495–501.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zierdt, C. H. and Tan, H. K. 1976. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde*, **50**, 3, 277-83.