Toxoplasmose amazonienne : biodiversité de Toxoplasma gondii chez l'homme et l'animal, conséquences pathologiques et mécanismes de virulence

Stéphane Simon

▶ **To cite this version:**

Stéphane Simon. Toxoplasmose amazonienne : biodiversité de Toxoplasma gondii chez l'homme et l'animal, conséquences pathologiques et mécanismes de virulence. Médecine humaine et pathologie. Université de Guyane, 2019. Français. NNT : 2019YANE0001 . tel-02636613

HAL Id: tel-02636613
https://theses.hal.science/tel-02636613

Submitted on 27 May 2020

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.

Université de Guyane

THESE

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Guyane

Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Physiologie et Biologie des organismes

Présentée et soutenue publiquement le 18 mars 2019 par :

Stéphane SIMON

Toxoplasmose amazonienne : Biodiversité de Toxoplasma gondii chez l'homme et l'animal, conséquences pathologiques et mécanismes de virulence

JURY

Bertrand DE TOFFOL	PU-PH (Tours)	Rapporteur
Sébastien BREUREC	PU-PH (Pointe-à-Pitre)	Rapporteur
Marie Laure DARDE	PU-PH (Limoges)	Examinateur
Isabelle VILLENA	PU-PH (Reims)	Examinateur
Mathieu NACHER	PU-PH (Cayenne)	Examinateur
Magalie DEMAR	PU-PH (Cayenne)	Directeur de thèse

Ecole Doctorale n°587 : Diversité, Santé et Développement en Amazonie

MON PAYS

Tu es le bois Balata,

Tu es le sang de ma vie,

Tu es l'eau de ma soif.

Tu es rire quand je suis content,

Tu es le soleil après la pluie,

Tu es la chaleur après le froid.

Tu es l'igname lorsque j'ai faim,

Tu es l'amour que j'ai

Mon pays

- - -

MO PEY

To sa bwa Balata,

To sa disan mo lavi,

To sa dilo pou mo swèf

To sa ari lò mo kontan,

To sa solèy aprè la pli,

To sa chalo dèyè frédi.

To sa yanm lò mo fen,

To sa lanmou ki mo ganyen

Mo péy.

Assunta RENAU FERRER
Traversée de la poésie guyanaise

Cette thèse a été réalisée grâce au soutien financier

de l'Université de Guyane - UFR de Sciences Médicales,
EA3593 - Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale

de l'Europe et du CNES dans le cadre du projet PO-FEDER BDVTG
(BioDiversité et Virulence de Toxoplasma gondii en Guyane).
Fonds européen de développement régional 2010-2013, PRESAGE n°30820.

du Laboratoire d'Excellence (LabEx) CEBA
Centre d'Etude de la Biodiversité Amazonienne

Et en collaboration avec :

le Centre Hospitalier Andrée ROSEMON de Cayenne

l'Institut Pasteur de la Guyane

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont permis à ces travaux *d'aboutir* :

En premier lieu, mon directeur de thèse : le Pr. Magalie PIERRE DEMAR *qui m'*a *donné la chance d'effectuer ces travaux sur cette parasitose* particulière et je lui exprime également *toute ma reconnaissance pour m'avoir* guidé sur ce s*ujet et de m'avoir* laissé une grande autonomie dans mes initiatives.

Le Pr. Mathieu NACHER, PU-PH Santé Publique qui a contribué à ce travail lors de *sa présidence à l'EPaT et même au*-delà. Je le remercie pour sa disponibilité et ses conseils judicieux. Je *suis honoré que vous participez à l'évaluation de ce travail. Merci également* pour ce voyage inoubliable à Rio.

Mes rapporteurs, le Bertrand DE TOFFOL et le Pr. Sébastien BREUREC qui ont *acceptés d'évaluer ce travail. Merci infiniment.*

Le Pr. Marie-*Laure DARDE pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire afin de me familiariser avec ce parasite ainsi que pour avoir accepté d'évaluer ce travail.* Je suis honoré que vous participiez à mon jury de thèse.

Le Dr. Daniel AJZENBERG, MCU-PH de Parasitologie-*Mycologie pour m'avoir* envoyé les souches nécessaires à cette étude mais aussi pour la visite de Limoges.

Le Dr. *Mirdad KAZANJI, Directeur de l'Institut PASTEUR de Guyane et le Dr Benoit de THOISY, vétérinaire spécialiste de la faune amazonienne, pour l'utilisation de l'animalerie, pour ton soutien et tes conseils 'animaliers'.*

Le Pr. *Ermano CANDOLFI pour m'avoir ai*dé sur la partie technique immunologique.

Le Dr. *Sylvianne PIED et Fabien pour avoir permis l'exploitation immunologique et l'interprétation des données.*

Les Drs. Denis BLANCHET et Christine AZNAR pour leur accueil dans le laboratoire NSB3 du service de Parasitologie – *Mycologie du Centre Hospitalier de Cayenne où j'ai fait* toutes mes expérimentations de culture cellulaire.

Je remercie également les personnes *qui m'ont aidé dans ce travail passionnant* :

Tous les membres (passés et présents) de l'équipe de l'EA3593 : Marine GINOUVES, Aurélia STEFANI, Julie PENEAU, Ghislaine PREVOT, Raymonde ONOZO, Vincent VERON pour votre écoute et votre bonne humeur.

Eudaric, pour t*a gestion des souris à l'animalerie de l'Institut Pasteur.*

Tous les 'toxoplasmologues' rencontrés lors de congrès ou de missions (CRB Reims, *CRB Limoges,...) qui m'ont initié à l'art de la 'toxoplasmologie'.*

A tous nos amis guyanais qui étaient là pour les moments festifs mais aussi qui ont été *d'un grand réconfort lors de moments* un peu plus difficiles : Sherif, Laetitia, Fabou, Mélanie, Fred, Sheza, David, Johan, Marie Do, Dorothée, Loïc, Lisa, Manu, Seb, Elsa, Laurent, Marie Laure, Vanessa, Alex, Coralie et David.

Une pensée particulière pour mes parents et ma famille restés en Métropole pendant notre parenthèse guyanaise.

Et enfin, un très grand merci à Anne Marie ainsi qu'à mes enfants, Tanguy, Robin et Dorian pour avoir été là pendant ces moments parfois délicats. *Cela n'a pas été* toujours *facile mais je suis arrivé au bout…*

J'ai une pensé*e toute particulière et très appuyée au Pr Bernard CARME qui a *initié ce travail, qui m'a guidé et fait confiance. J'ai été très honoré de travailler avec vous.

Un très grand merci à tous pour ces merveilleuses années passées en Guyane.

Je ne les oublierai jamais.

RESUME

Découvert en 1908 simultanément en Afrique du Nord et au Brésil, Toxoplasma gondii est un parasite des vertébrés à sang chaud (mammifères et oiseaux). Ce parasite, responsable de la toxoplasmose, se développe à l'intérieur des cellules. La contamination humaine est principalement orale par ingestion de viandes, de légumes ou d'eaux contaminées par des oocystes (œufs) de T. gondii. Mais il peut également y avoir contamination du fœtus par passage du parasite à travers la paroi placentaire. Et dans de très rares cas, une contamination peut aussi avoir lieu lors d'une transfusion sanguine ou d'une transplantation.

Bien qu'on estime que plus d'un tiers de la population mondiale soit porteur de ce parasite, cette maladie reste bénigne chez les personnes immunocompétentes. Elle est par contre, beaucoup plus grave chez les personnes immunodéprimées pour diverses raisons (SIDA, chimiothérapies,...). Le parasite peut alors se développer et provoquer de graves lésions neurologiques ou oculaires pouvant entraîner le décès du patient si un traitement n'est pas mis en place.

Les souches de T. gondii circulantes en Amérique du Nord et en Europe ont été regroupées en trois grandes lignées clonales : type I (virulence importante), type II (virulence intermédiaire) et type III (faible virulence). C'est le type II qui est retrouvé très majoritairement. Avec le développement d'outils de biologie moléculaire, de nouvelles souches, avec un génotype particulier, ont été caractérisées. Des études ont montré la présence de souches avec des génotypes différents des 3 souches clonales en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud. En Guyane française, la présence de souches «atypiques» de T. gondii chez les animaux sauvages et domestiques a été émise en évidence au début des années 2000. Ces souches non type I, type II ou type III ont un pouvoir pathogène très important, même chez les personnes immunocompétentes. Plusieurs cas ont été diagnostiqués au centre hospitalier de Cayenne, mettent en jeu le pronostic vital des patients.

Le but de notre étude est d'essayer de comprendre les mécanismes de virulence mis en place par ces souches 'atypiques' de T. gondii en Guyane si particulières et méconnues. 10 souches ont été sélectionnées : 5 souches isolées de patients hospitalisés au Centre Hospitalier de Cayenne ayant des symptômes avec un gradient de sévérité mettant en jeu le pronostic vital et 5 souches isolées pour 2 de la faune sauvage et pour 3 de la faune domestique. Ces souches ont été comparées à 3 souches de référence correspondant aux 3 lignées clonales (type I, II et III). Cette étude a comporté 3 volets :

Un volet portant sur la génétique afin de déterminer si la virulence de ces souches été liée à une modification de leur ADN. La comparaison de 13 marqueurs microsatellites a révélé un grand polymorphisme des souches guyanaises confirmant le fait que ces souches ne sont pas issues d'une seule lignés. Le séquençage de 8 gènes potentiellement impliqué dans la virulence a également démontré une divergence importante sur certains gènes comme GRA3 ou ROP18 pourtant décrit comme un acteur majeur de la virulence de T. gondii. Une étude phylogénétique a démontré que sur les 10 souches étudiées, 7 ont un ancêtre commun avec la souche RH de type I (la plus virulente), 1 avec la souche PRU de type II (virulence intermédiaire) et 2 avec la souche VEG de type III (virulence faible).L'analyse de 8 gènes potentiellement impliqué dans la virulence des souches a montré une surexpression de certains gènes comme ROP18 mais uniquement dans les souches guyanaises et la souche RH. L'utilisation de puces à ADN a montré que sur les 8 gènes séquencés, seul le gène ROP18 était surexprimé sauf pour les souches ayant une forte variabilité génétique. D'autres gènes présentent une surexpression dans les souches guyanaises avec des taux proche de ceux présents dans la souche RH comme la nucléoside-triphosphatase ou la cyclophiline.

Un autre volet a consisté à étudier la virulence dans le modèle murin. Toutes les souches guyanaises présentent un profil de virulence proche de la souche RH avec une mortalité importante et rapide. Les valeurs obtenues pour la Dose Létale 50 (DL50) et 99 (DL99) ont confirmé le caractère virulent de ces souches. Avec ces résultats, nous avons établit un score prédictif de virulence afin de classer les souches guyanaises par rapport aux souches de référence. Les 10 souches étudiées ont un score compris entre 2,42 et 4,9 proche de la souche RH avec un score de 5,89. Les souches PRU et VEG ont respectivement des scores de 1,07 et 0,32.

Le dernier volet a été l'étude de 24 cytokines - chemokines lors la réponse immunitaire chez le modèle murin à T0h, T24h, T48h, T96h et T168h post infection. L'infection à T. gondii chez la souris provoque une augmentation de certaines cytokines-chemokines qui peut être très important notamment chez la souche RH. La réalisation de Heatmaps et d'un Hierarchical Clustering sous Perseus confirme la présence de 2 clusters qui se démarquent chez RH, qu'on en retrouve seulement pour les autres souches. Un cluster consensus en cependant présent chez toutes les souches (IFN-γ, IL-12p40, l'IL-15, le GCSF et IP10) ce qui oriente la réponse immunitaire vers la voie Th1. Une analyse MDS-LDA sous 'R' nous a permis de dégager un profil immunitaire des souches face à l'infection à T. gondii.

On retrouve donc plusieurs groupes distincts : RH seul ; un groupe avec VEG et JAG, un groupe avec FAM0001 et PRU et le dernier groupe avec AKO, MEL et VIT0001.

Si la présence de souches ‘atypiques’ de T. gondii en Guyane n’est plus à démontrer, il est à noter que ces souches ont des caractéristiques génétiques uniques en dehors des souches clonales rencontrées habituellement. Même si certains gènes des souches atypiques ont des similitudes avec des souches ayant une virulence faible, on constate cependant que cela ne diminue pas leur virulence. La réaction immunitaire mise en place par l’hôte ne parvient pourtant pas à éliminer l’infection qui peut se révéler grave en l’absence de traitement.

SUMMARY

Discovered in 1908 simultaneously in North Africa and Brazil, Toxoplasma gondii is a parasite of warm-blooded vertebrates (mammals and birds). This parasite, responsible for toxoplasmosis, develops inside the cells. Human contamination is mainly oral by ingestion of meat, vegetables or water contaminated with T. gondii oocysts (eggs). But there may also be contamination of the fetus by passage of the parasite through the placental wall. And in very rare cases, contamination canal so occur during a blood transfusion or transplant.

Although it is estimated that over a third of the world's population carries this parasite, it remains benign in immunocompetent persons. On the other hand, it is much more serious in people with diverse causes of immunosuppression (AIDS, chemotherapy, ...). Parasites can then develop and cause serious neurological or ocular lesions that can lead to the death of the patient if treatment is not implemented.

Circulating T. gondii strains in North America and Europe have been grouped into three major clonal lineages: type I (high virulence), type II (intermediate virulence) and type III (low virulence). Type II is by far the most predominant. With the development of molecular biology tools, new strains, with a particular genotype, have been characterized. Studies have shown the presence of strains with different genotypes from the 3 clonal strains in Africa, Asia and South America. In French Guiana, the presence of "atypical" strains of T. gondii in wild and domestic animals was prominently reported in the early 2000s. These non-type I, type II or type III strains have a very high pathogenicity, even in immunocompetent persons. Several cases have been diagnosed in Cayenne hospital in patients with life-threatening presentations.

The aim of our study was to try to understand the virulence mechanisms of these T. gondii 'atypical' strains of French Guiana. 10 strains were selected: 5 strains isolated from patients hospitalized at Cayenne Hospital with gradient of severe symptoms and 5 isolated strains for 2 from wild and 3 from domestic animals. These strains were compared to 3 reference strains corresponding to the 3 clonal lines (type I, II and III). This study consisted of 3 components:

A section on genetics to determine whether the virulence of these strains was linked to a modification of their DNA. The comparison of 13 microsatellites markers revealed a large polymorphism of the Guianese strains confirming that thes estrains did not come from a

single lineage. Sequencing of 8 genes potentially involved in virulence has also shown significant divergence on some genes such as GRA3 or ROP18, described as a major player in T. gondii virulence. A phylogenetic study has shown that of the 10 strains studied, 7 had a common ancestor with the Type I RH strain (the most virulent), 1 with the type II PRU strain (intermediate virulence) and 2 with the type III VEG strain (weak virulence). The analysis of 8 genes potentially involved in the virulence of the strains showed an overexpression of certain genes like ROP18 but only in the Guyanese strains and the RH strain. The use of microarrays showed that out of the 8 sequenced genes, only the ROP18 gene was overexpressed except for strains with high genetic variability. Other genes are overexpressed in Guianese strains with levels close to the RH strain such as nucleosidetriphosphatase or cyclophilin.

Another component was to study virulence in the murine model. All Guianese strains have a virulence profile close to the RH strain with high and rapid mortality. The values obtained for LD 50 and LD99 confirmed the virulent nature of these strains. With these results, we established a predictive virulence score to classify the Guyanese strains relative to the reference strains. The 10 strains studied have a score between 2.42 and 4.9 close to the RH strain with a score of 5.89. The PRU and VEG strains have scores of 1.07 and 0.32, respectively.

The last part was the study of 24 cytokines – chemokines during the immune response in the murine model at T0h, T24h, T48h, T96h and T168h post infection. T. gondii infection in mice causes an increase in certain cytokines-chemokines which can be very important, especially in the RH strain. The realization of Heatmaps and a Hierarchical Clustering under Perseus confirms the presence of 2 clusters that stand out in RH, found only for the other strains. A consensus cluster, however, is present in all strains (IFN-γ, IL-12p40, IL-15, GCSF and IP10) which directs the immune response towards the Th1 pathway. An MDS-LDA analysisunder 'R' enabled us to identify an immune profile of the strains in the face of T. gondii infection. We thus find several distinct groups: RH alone; a group with VEG and JAG, a group with FAM0001 and PRU and the last group with AKO, MEL and VIT0001.

While the presence of 'atypical' strains of T. gondii in French Guiana well established, it should be noted that these strains have unique genetic characteristics outside the usually encountered clonal strains. Although some genes of atypical strains have similarities with strains with low virulence, it is found that this does not decrease their

virulence. However, the host's immune response fails to eliminate the infection, which can be serious if left untreated.

Toxoplasmose amazonienne :
Biodiversité de Toxoplasma gondii chez l'homme et l'animal, conséquences pathologiques et mécanismes de virulence

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 7

RESUME 9

SUMMARY 13

SOMMAIRE 17

ABREVIATIONS 21

LISTE DES TABLEAUX 23

LISTE DES FIGURES 25

PREAMBULE 27

I. INTRODUCTION 29
I. 1. LA TOXOPLASMOSE : UNE DECOUVERTE 'CENTENAIRE' 29
I. 2. TAXONOMIE DE TOXOPLASMA GONDII 31
I. 3. CYCLE EVOLUTIF ET TRANSMISSION 32
I. 3. 1. Le cycle sexué 32
I. 3. 2. Le cycle asexué 33
I. 3. 3. Transmission 33
I. 4. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES 34
I. 4. 1. L'apicoplate 34
I. 4. 2. Le complexe apical 34
I. 4. 3. Le complexe des membranes internes 36
I. 5. LES DIFFERENTES FORMES DE T. GONDII 36
I. 5. 1. Le tachyzoïte 36
I. 5. 2. Le bradyzoïte 41
I. 5. 3. Le sporozoïte 43
I. 6. PREVALENCE 45
I. 6. 1. Chez l'homme 45
I. 6. 2. Chez les félidés 46
I. 6. 3. Chez les autres animaux 47
I. 7. FORMES CLINIQUES 50

I. 7. 1. Forme asymptomatique 50
I. 7. 2. Forme symptomatique 'ganglionnaire' 51
I. 7. 3. Forme congénitale 51
I. 7. 4. Toxoplasmose oculaire 52
I. 7. 5. Toxoplasmose chez le sujet immunodéprimé 52
I. 7. 6. Toxoplasmose 'atypique' 53
I. 8. BIODIVERSITE GENETIQUE 53
I. 8. 1. Marqueurs génétiques 53
I. 8. 2. Analyse des microsatellites 55
I. 8. 3. Classification 56
I. 8. 4. Evolution des souches 59
I. 9. REPONSE IMMUNITAIRE 61
I. 9. 1. La réponse immunitaire innée 61
I. 9. 2. La réponse immunitaire adaptative 64
I. 10. VIRULENCE DE T. GONDII 64
I. 10. 1. Chez la souris 64
I. 10. 2. Chez l'homme 65
I. 10. 3. Facteurs de virulence dans la cellule hôte 65
I. 10. 3. 1. Les protéines des granules denses 66
I. 10. 3. 2. Les protéines des rhoptries 67
I. 10. 3. 3. Les protéines du micronème 68
I. 10. 3. 4. Les protéines antigénique de surface 68

II. ETUDE DE LA VIRULENCE DES SOUCHES AMAZONIENNES DANS LE MODELE MURIN ET DES MECANISMES DE PATHOGENICITE MOLECULAIRE ET IMMUNOLOGIQUE 69
II. 1. DETERMINATION DE LA VIRULENCE CHEZ LA SOURIS 72
II. 1. 1. Méthodologie 72
II. 1. 1. 1. Souches étudiées 72
II. 1. 1. 2. Culture des tachyzoïtes 77
II. 1. 1. 3. Règles éthiques 78
II. 1. 1. 4. Souris 78
II. 1. 1. 5. Inoculation à la souris 78
II. 1. 1. 6. Quantification des tachyzoïtes injectés 78
II. 1. 1. 6. 1. Extraction d'ADN 79
II. 1. 1. 6. 2. Quantification par PCR en temps réel 79
II. 1. 1. 7. Quantification des tachyzoïtes dans les cœurs de souris 80
II. 1. 1. 7. 1. Extraction d'ADN 80
II. 1. 1. 7. 2. Quantification par PCR en temps réel 80
II. 1. 1. 8. Détermination de la DL_{50} et de la DL_{99} 81
II. 1. 1. 9. Calcul du Score de Virulence (SV) 81
II. 1. 2. Résultats et discussion thématique 82
II. 1. 2. 1. Culture des tachyzoïtes 82
II. 1. 2. 2. Quantification des tachyzoïtes injectés 85
II. 1. 2. 3. Détermination de la virulence des souches 86
II. 1. 2. 4. Détermination de la DL_{50} et DL_{99} 92
II. 1. 2. 5. Quantification des tachyzoïtes dans les cœurs de souris 95
II. 1. 2. 6. Score de virulence 98
II. 2. ANALYSE GENETIQUE DE MARQUEURS MOLECULAIRES 99
II. 2. 1. Méthodologie 99

II. 2. 1. 1. Séquençage des microsatellites 99
II. 2. 1. 1. 1. Extraction d'ADN 99
II. 2. 1. 1. 2. PCR classique 99
II. 2. 1. 2. Séquençage des gènes de virulence 100
II. 2. 1. 2. 1. Extraction d'ADN 100
II. 2. 1. 2. 2. PCR classique et séquençage 100
II. 2. 1. 2. 3. Arbre phylogénétique 100
II. 2. 1. 3. Expression de gènes 101
II. 2. 1. 3. 1. Culture des tachyzoïtes 101
II. 2. 1. 3. 2. Extraction de l'ARN total 101
II. 2. 1. 3. 3. Analyse de l'ARN total 101
II. 2. 1. 3. 4. Reverse Transcription 101
II. 2. 1. 3. 5. Quantification par PCR en temps réel 101
II. 2. 1. 4. Puces à ADN 102
II. 2. 1. 4. 1. Méthodologie 102
II. 2. 1. 4. 2. Utilisation des puces T. gondii 104
II. 2. 1. 4. 3. Traitement des données transcriptomiques 105
II. 2. 2. Résultats 105
II. 2. 2. 1. Séquençage des marqueurs microsatellites 105
II. 2. 2. 2. Séquençage des gènes de virulence 110
II. 2. 2. 3. Arbre phylogénétique 113
II. 2. 2. 4. Expression de gènes 114
II. 2. 2. 4. 1. Analyse de l'ARN total 114
II. 2. 2. 4. 2. Quantification des gènes de virulence 121
II. 2. 2. 5. Analyse transcriptionnelle (Puces à ADN) 126
II. 3. ANALYSE DU PROFIL IMMUNOLOGIQUE DES SOUCHES DE T. GONDII CHEZ LA SOURIS 136
II. 3. 1. Méthodologie 136
II. 3. 2. Analyses statistiques 140
II. 3. 3. Résultats des dosages 140

III. DISCUSSION GLOBALE 157

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 169

V. TRAVAUX SCIENTIFIQUES DURANT LA PERIODE DE THESE 171

VI. ANNEXES 175
VI. 1. Annexe 1 : Fiche technique des cellules HFF-1, ATCC® : SCRC-1041TM 176
VI. 2. Annexe 2 : Fiche technique des souris Swiss CD-1® 179
VI. 3. Annexe 3 : Amorces pour l'amplification des microsatellites 180
VI. 4. Annexe 4 : Amorces pour l'amplification des gènes de virulence 181
VI. 5. Annexe 5 : Amorces et sondes pour la détection de l'expression de gène 182
VI. 6. Annexe 6 : Composition de la puce à ADN de T. gondii 183
VI. 7. Annexe 7 : Résumé du traitement des données transcriptomiques des puces Affymetrix par la plate-forme Genom'ic 185
VI. 8. Annexe 8 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences des gènes de virulence et des microsatellites 186

VI. 9. Annexe 9 : Résultats des dosages des 23 cytokines – chemokines par Luminex 187

VII. BIBLIOGRAPHIE 199

ABREVIATIONS

µl	Microlitre
µM	MicroMolaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	Acide RiboNucléique Ribosomal
ARNt	Acide RiboNucléique Total
ATCC	American Type Culture Collection
BET	Bromure d'éthidium
CEE	Communauté Economique Européenne
Chr1a	Chromosome 1a
DL	Dose Létale
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRA	Granules denses
Hg	Haplogroupe
HFF-1	Human Foreskin Fibroblasts
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycans
IFN-γ	Interféron-gamma
IGN	Institut National de l'Information Géographique et Forestière
IL	Interleukine
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
kDa	Kilo Dalton
km	Kilomètre
Mb	Mega bases (10^6 bases)
MGB	Minor Groove Binder
MIC	Micronème
min	Minute
MS	Microsatellite
ml	Millilitre
mM	MilliMolaire
NFQ	Non Fluorescent Quencher
NK	Natural Killer
nm	Nanométre
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns

pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaine)
qPCR	PCR temps réel
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROP	Rhoprie
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Seconde
SAG	Surface Antigen
SV	Score de Virulence
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficienceAquise
STR	Short Tandem Repeats
TGF-β	Transfmorming Growth Factor-Beta
TLRs	Toll-Like Receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-Alpha
UV	UltraViolet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Marqueurs microsatellites pour le typage de T. gondii. 56
Tableau 2 : Souches de T. gondii isolées de patients 75
Tableau 3 : Souches de T. gondii isolées de la faune. 76
Tableau 4: Souches de référence de T. gondii 76
Tableau 5 : Séquences du système de détection de T. gondii par qPCR 79
Tableau 6 : Pourcentage de mortalité chez les souris inoculées 91
Tableau 7 : Moyenne des jours de survie chez les souris inoculées 92
Tableau 8 : Détermination de la DL_{50} et de la DL_{99} 94
Tableau 9 : Longueur et composition des microsatellites 109
Tableau 10 : Analyse transitionnelle de 10 gènes 131
Tableau 11 : Analyse transcriptionnelle des 8 gènes de virulence 132
Tableau 12 : Analyse transcriptionnelle de gènes 'candidats' 133
Tableau 13 : Exemple de production de cytokines pour les 3 souches de référence 141
Tableau 14 : Cytokines - chemokines produites 143
Tableau 15: Synthèse des résultats les plus significatifs 165

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie de Ctenodactylus gundi. 29
Figure 2 : Position taxonomique de Toxoplasma gondii..... 31
Figure 3 : Cycle de vie de Toxoplasma gondii et contamination à l'Homme..... 32
Figure 4 : Représentation schématique du conoïde de T. gondii. 35
Figure 5 : Schématique de la structure de la pellicule de T. gondii. 36
Figure 6 : Représentation schématique d'un tachyzoïte de T. gondii. 37
Figure 7 : Schéma du glideosome de T. gondii. 38
Figure 8 : Schéma de l'invasion d'une cellule par T. gondii. 39
Figure 9 : 8 tachyzoïtes dans une vacuole parasitophore (VP). 40
Figure 10 : Schéma de la multiplication des tachyzoïtes par endodygénie. 40
Figure 11 : Lyse de la cellule-hôte et libération des tachyzoïtes. 41
Figure 12 : Comparaison entre un tachyzoïte et un bradyzoïte..... 42
Figure 13 : Facteurs liés à l'interconversion entre tachyzoïtes et bradyzoïtes..... 43
Figure 14 : Oocystes de T. gondii. (a) non sporulé, (b) contenant 2 sporocystes. 44
Figure 15 : Carte de séroprévalence chez les femmes en âge de procréer. 46
Figure 16 : Risques de contamination congénitale. 52
Figure 17 : Distribution géographique des génotypes de T. gondii 58
Figure 18 : Evolution des lignées clonales..... 60
Figure 19 : Activation des Toll-Like receptors par T. gondii 63
Figure 20 : Répartition des 4 groupes de protéines impliquées dans la virulence. 66
Figure 21 : Lieux présumés de contaminations humaines et sites de capture..... 77
Figure 22 : Evolution d'une culture de la souche RH sur cellules HHF-1 85
Figure 23 : Quantification du nombre de tachyzoïtes injectés selon les groupes par qPCR 86
Figure 24 : Courbes de mortalité des souris après injections de doses croissantes de tachyzoïtes..... 90
Figure 25 : Courbes de détermination de la DL_{50} et de la DL_{99}..... 93
Figure 26 : Quantité de tachyzoïtes dans 25 mg de cœur en fonction de la dose de tachyzoïtes injectés. 97
Figure 27 : Quantité moyenne de tachyzoïtes pour 25 mg de cœur en fonction de la mort ou de la survie des souris injectées. 97

Figure 28 : Calcul du score de virulence..... 98
Figure 29 : Principe des puces ADN par hybridation compétitive 103
Figure 30 : Principe des puces Affymetrix 104
Figure 31 : Séquençage de 13 marqueurs microsatellites. 108
Figure 32 : Alignement du gène GRA3 110
Figure 33 : Alignement du gène ROP18 111
Figure 34 : Pourcentage de divergence en nucléotides par rapport à RH. 111
Figure 35 : Pourcentage de divergence en acides aminées par rapport à RH 112
Figure 36 : Arbre phylogénétique à partir des 8 gènes de virulence..... 113
Figure 37 : Exemples d'images de 'gel' du Bioanalyzer 115
Figure 38 : Evolution de l'apparition de la sous unité 23S de l'ARNr de T. gondii (Souche AKO)..... 116
Figure 39 : Evolution des ARNr 26S et 28S après infection de HFF1 120
Figure 40 : Courbes d'expression de gènes 125
Figure 41 : Principe de la technologie Luminex 140
Figure 42 : Courbes de dosage de certaines cytokines – chemokines chez la souris selon les souches 147
Figure 43 : Heatsmaps et Hierachical clustring générés avec le logiciel Perseus.... 150
Figure 44 : Analyse par MDS-LDA sous R sur les 8 souches sélectionnées..... 154
Figure 45 : Analyse par MDS-LDA sous R à 168h. sans la souche RH..... 155

PREAMBULE

La Guyane est un département français composé à près de 90% par une forêt tropicale humide. L'intrusion de l'Homme dans cet écosystème fermé a eu pour conséquence l'émergence de nouveaux microorganismes pathogènes. C'est le cas de Toxoplasma gondii, protozoaire intracellulaire responsable de la Toxoplasmose, zoonose cosmopolite que l'on retrouve sur tous les continents. En Guyane, depuis les années 2000, de nombreux cas de toxoplasmose disséminée, certaines menaçant le pronostic vital, ont été décrits chez des sujets immunocompétents. Ces formes sévères, connues localement sous le nom de toxoplasmose « amazonienne », ont remis en cause cette vision très « occidentale » d'une infection toujours bénigne chez l'immunocompétent, liée à un cycle domestique du toxoplasme. En effet, elle illustre la notion de diversité génétique chez Toxoplasma du fait d'isolement de souches de T. gondii ne correspondant pas à la classification clonale jusqu'alors décrite.

A ce jour, outre les descriptions cliniques et épidémiologiques profuses, seulement quelques études expérimentales ciblées sur les souches « amazoniennes » ont été menées et rapportées dans la littérature.

Au décours de généralités rappelant les notions connues et décrites dans la littérature, nous présenterons l'étude expérimentale réalisée sur la virulence de souches dans le modèle murin afin de démontrer leur pouvoir pathogène. Les mécanismes de type moléculaires (expressions de gène, analyse de puces à ADN) et immunologiques (profil de cytokines et interleukines…) pouvant expliquer la pathogénicité seront détaillées dans la dernière partie du document

I. INTRODUCTION

I. 1. LA TOXOPLASMOSE : UNE DECOUVERTE 'CENTENAIRE'

La première description de ce parasite remonte au début du XX^{e} siècle, en Afrique du Nord (Nicolle and Manceaux 1908) chez Ctenodactylus gundi, un rongeur sauvage (**Figure 1**), et semblant être du genre Leishmania. Simultanément, il est aussi décrit au Brésil, chez un lapin (Splendore 1908). Ce n'est qu'un an plus tard que Nicolle nomme ce parasite : Toxoplasma gondii (Nicolle and Manceaux 1909) en raison de la forme en croissant du tachyzoïte (du grec *toxon* = arc et plasma = forme) et du rongeur dans lequel il a été découvert. A ce moment, aucune notion concernant son cycle et son importance en pathologie humaine et animal n'est connu.

Figure 1 : Photographie de Ctenodactylus gundi.
(source : http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Gundi_Ctenodactylus_gundi_051117_2.jpg)

Durant les années 1920, le premier cas de toxoplasmose congénital avec hydrocéphalie et lésions oculaires de choriorétinite est rapporté (Janku 1923). A la fin des années 1930, T. gondii est considéré comme un agent pathogène pour l'homme lorsqu'il est isolé d'un nouveau-né, mort d'une encéphalomyélite aigüe (Wolf et al. 1939). En 1940, Pinkerton et Weinman (Pinkerton and Weinman 1940) évoquent une infection autre que congénitale lorsque le parasite est isolé chez un adolescent qui succomba à une pneumonie. Durant ces mêmes années, le développement des outils sérologiques (Sabin and Feldman 1948) démontrent la forte prévalence de la toxoplasmose humaine. Pendant les années 1960, la contamination par ingestion de viande insuffisamment cuite est établi (Desmonts et al. 1965). Par la suite, le cycle biologique et le mode de transmission du parasite mettant en avant

le rôle des félidés comme hôtes définitifs ont été identifiés (Hutchison 1965; Frenkel et al. 1969).

Les décennies suivantes ont vu la parution de très nombreux articles sur le parasite et sa pathologie. Avec l'apparition du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) au début des années 1980, la toxoplasmose s'est classée au premier rang des maladies opportunistes. En l'absence de prophylaxie, entre 30 à 40% de personnes atteints du SIDA ont déclaré une encéphalite à Toxoplasma (Leport et al. 1996), soulevant l'hypothèse qu'il puisse exister un lien entre la pathogénicité du parasite et la compétence du système immunitaire de l'hôte à contenir l'infection à T. gondii.

Dans les années 90, apparait la notion de souches clonales. Les souches isolées en Europe et en Amérique du Nord ont ainsi été classées dans un des 3 groupes (Type I, Type II et Type III) en fonction de 6 marqueurs génétiques (Howe and Sibley 1995). Le type II est alors largement majoritaire en Europe et en Amérique du Nord. Dans de très rares cas (< 5%), les souches n'appartiennent pas à l'une des 3 lignées clonales. Il s'agit généralement de souches 'recombinantes' présentant un mélange d'allèles de type I, II ou III dans leurs génotypes ou de souches 'exotiques' avec certains allèles présentant un polymorphisme non présent dans l'une des 3 lignées clonales. L'étude de ces souches sur le modèle murin a également démontré une différence de virulence entre les 3 lignées clonales (Howe et al. 1996; Sibley and Boothroyd 1992).

Cependant, le développement d'outils moléculaires a permis une analyse génétique plus poussé des différentes souches de T. gondii. L'analyse isoenzymatique (Bossi et al. 1998; Darde et al. 1998), la PCR-RFLP (Su et al. 2006a) et l'étude des marqueurs microsatellites (Ajzenberg et al. 2010) de plusieurs souches ont montré un polymorphisme plus complexe. Plusieurs études ont décrit des souches avec des génotypes différents des 3 lignées clonales en Afrique (Al-Kappany et al. 2010; Mercier et al. 2010), en Asie (Jiang et al. 2013; Li et al. 2014; Salant et al. 2013) et en Amérique Latine (Shwab et al. 2014; Vitaliano et al. 2014). En Guyane française, des études ont montré la présence de souches «atypiques» (non type I, non type II et non type III) de T. gondii chez les animaux sauvages et domestiques (Demar et al. 2008; Mercier et al. 2011). Ces souches ont un pouvoir pathogène très important, même chez les personnes immunocompétentes (Carme et al. 2002; Demar et al. 2007b).

I. 2. TAXONOMIE DE TOXOPLASMA GONDII

Agent responsable de la toxoplasmose, une zoonose cosmopolite, Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire obligatoire qui appartient au phylum des Apicomplexa, classe des Coccidia, ordre des Eucoccidiorida, famille des Sarcocystidae (**Figure 2**). Ce phylum regroupe également d'autres pathogènes humains (Plasmodium, Cryptosporidia, Isospora) ainsi qu'animaux (Neospora, Eimeria, Babesia, Theileria).

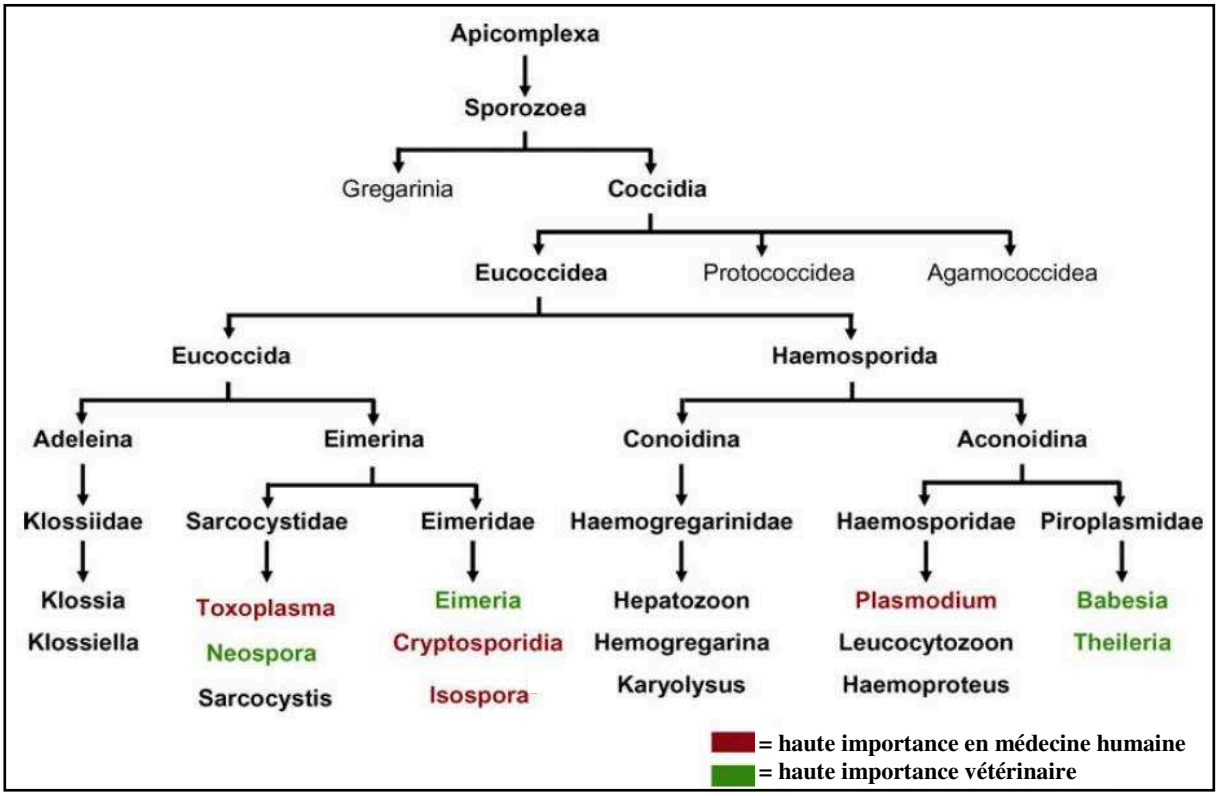


Figure 2 : Position taxonomique de Toxoplasma gondii.
D'après (Beck et al. 2009)

I. 3. CYCLE EVOLUTIF ET TRANSMISSION

Le cycle de vie de Toxoplasma gondii comporte un cycle sexué chez l'hôte définitif (félidés) et un cycle asexué chez l'hôte intermédiaire (mammifère ou oiseau) (**Figure 3**).

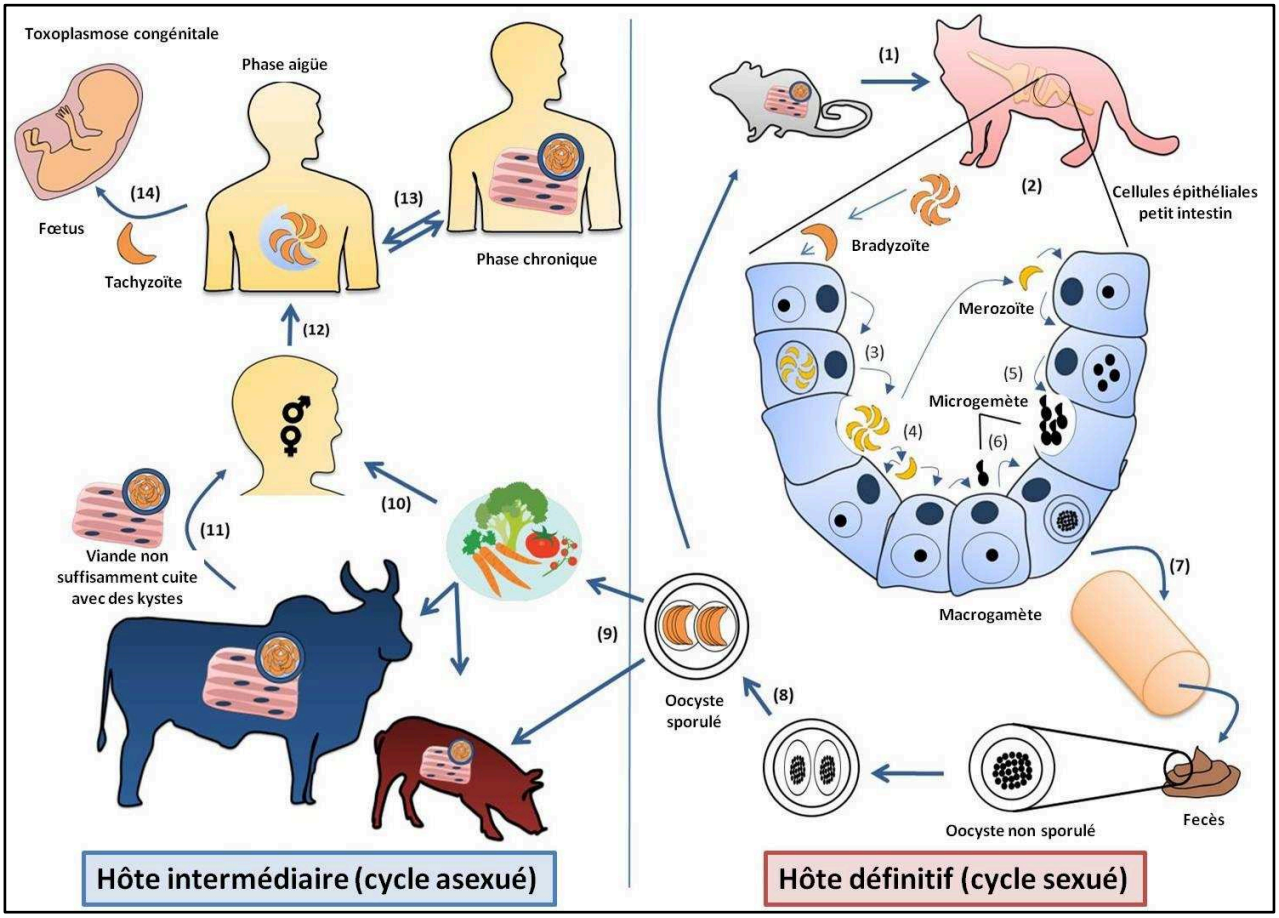


Figure 3 : Cycle de vie de Toxoplasma gondii et contamination à l'Homme.
D'après (Duque et al. 2013)

I. 3. 1. Le cycle sexué

Chez le chat (et les félidés en général), la contamination se fait par voie orale par ingestion d'une proie infectée (kystes contenant des bradyzoïtes) ou plus rarement par de la terre ou de l'eau souillée (oocystes matures). Dans l'intestin du félidé, ces formes évoluent rapidement en tachyzoïtes et se différencient à nouveau en mérozoïtes dans les cellules épithéliales de l'hôte définitif. Il y a ensuite multiplication de ces formes asexuées par schizogonie (division du noyau puis fragmentation du cytoplasme). Une fois libérés, les mérozoïtes se différencient en microgamètes males et macrogamètes femelles. La fécondation des macrogamètes par les microgamètes qui se fait à l'intérieur des cellules épithéliales conduit à la production d'oocystes immatures non sporulés (non infectieux). Ils sont ensuite

libérés dans l'intestin puis éliminés par millions dans l'environnement dans les fèces du félidé mais pendant une période assez courte (entre 7 à 15 jours) (Dubey 2006).

Dans le milieu extérieur, la sporogonie permet, en 1 à 5 jours, la maturation de l'oocyste immature en oocyste contenant 2 sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes infectieux. Ces oocytes infectieux, très résistants (Fritz et al. 2012; Kuticic and Wikerhauser 1996), peuvent alors attendre plusieurs mois avant d'être ingérer soit par un hôte intermédiaire pour effectuer un cycle asexué, soit, plus rarement par un félidé non immunisé pour recommencer le cycle sexué.

I. 3. 2. Le cycle asexué

La contamination d'un animal homéotherme (mammifère ou oiseau) se fait principalement soit par des oocystes infectieux issus de l'environnement, soit par de kystes contenus dans de la viande infectée peu ou pas cuite. Lors de l'ingestion, l'action des sucs digestifs va permettre la libération des sporozoïtes ou des bradyzoïtes qui vont pénétrer dans les cellules épithéliales intestinales. Ils vont alors rapidement se différencier en tachyzoïtes, capable d'infecter tous les types cellulaires via la voie sanguine et les macrophages. C'est la phase aigüe de la maladie, phase durant laquelle le parasite peut infecter le fœtus (Moncada and Montoya 2012). Sous l'action du système immunitaire, les tachyzoïtes se différencient à nouveaux en bradyzoïtes à l'intérieur d'un kyste toxoplasmique, principalement au niveau des tissus musculaires et nerveux. C'est la phase chronique de la maladie. Les hôtes intermédiaires infectés peuvent devenir des sources de contamination pour un nouvel hôte intermédiaire carnivore (cycle asexué) ou pour un félidé (cycle sexué).

I. 3. 3. Transmission

Comme nous venons de le voir, il existe plusieurs modes de contamination possible :

- Transmission alimentaire : c'est la plus courante. A partir de viande infectée par des bradyzoïtes ou d'aliments souillés par de oocystes, l'hôte intermédiaire ou définitif non immunisé se contamine par ingestion.
- Transmission fœto-maternelle : le passage transplacentaire des tachyzoïtes est possible lors de la phase aigüe. Il y a alors danger pour le fœtus en développement surtout lors des premières semaines de grossesse.
- Transmission par transplantation d'organe : elle reste très exceptionnelle (Derouin et al. 2008)

I. 4. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

Comme toutes les cellules eucaryotes, on retrouve chez T. gondii, tous les organites classiques : un noyau de 65 Mb réparti sur 14 chromosomes de 2 à 8 Mb (Sibley and Ajioka 2008) et codant pour environ 8 000 gènes dont la plupart n'ont pas d'introns (Xia et al. 2008), des ribosomes, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, une seule mitochondrie et une membrane plasmique. On retrouve aussi quelques organites particuliers spécifiques au phylum des Apicomplexa :

I. 4. 1. L'apicoplate

L'apicoplaste est un plaste d'origine végétal n'ayant plus de fonction de photosynthèse. Il s'agirait d'une cyanobactérie endocytée par une algue rouge, elle-même endocytée par l'ancêtre des Apicomplexa. Ce qui expliquerait la présence de 4 membranes. Malgré la présence d'un génome de 35 kb (Foth and McFadden 2003), la plupart de ses protéines sont codées par le noyau. Sa fonction serait associée à la synthèse d'acides gras qui seraient ensuite transmis vers le réticulum endoplasmique via certaines zones de contact (Bisanz et al. 2006).

I. 4. 2. Le complexe apical

Il s'agit de toute la partie antérieure du parasite. Ce complexe est composé :

- D'un conoïde (**Figure 4**) : cylindre constitué de microtubules de 26 à 30 nm de long enroulé en spirale. Il est délimité en haut par 2 anneaux pré-conoïdaux et en bas par un anneau polaire. C'est de cet anneau que partent 22 microtubules sous pelliculaire formant le cytosquelette. Le conoïde est un organite rétractile qui est extrudé par un flux de calcium lors de l'invasion cellulaire. Il permet par la suite, le passage des organites à activités sécrétoires guidés par 2 microtubules intra conoïde (Hu et al. 2006).

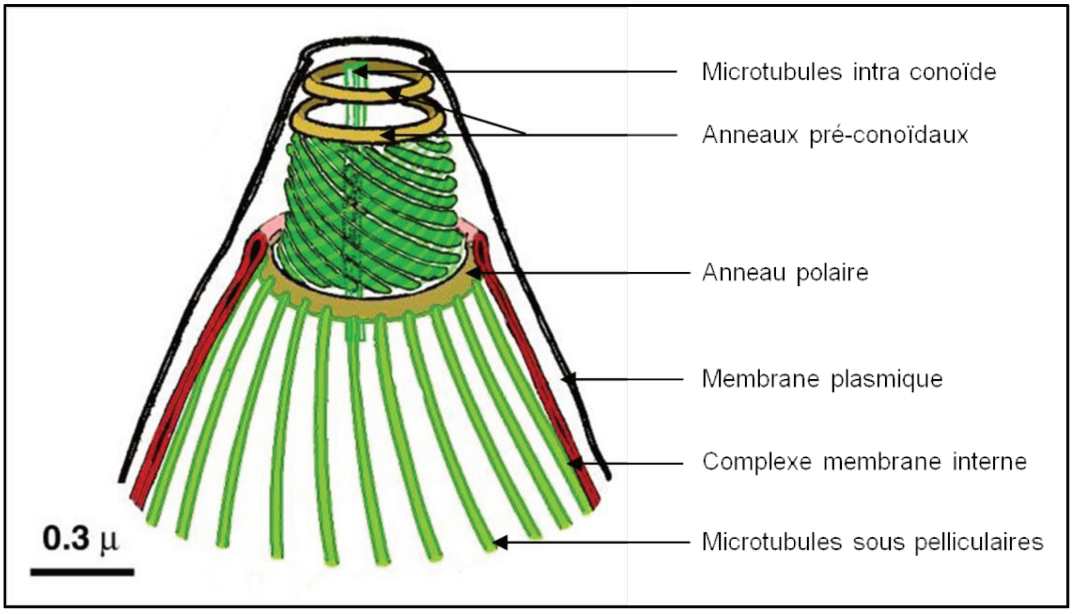


Figure 4 : Représentation schématique du conoïde de T. gondii.
D'après (Heaslip et al. 2009)

- des organites à activités sécrétoires (micronèmes, rhoptries, granules denses) utilisées lors de la pénétration et de la multiplication du parasite dans les cellules :
  - Rhoptries : ce sont des organites en forme de goutte d'eau (0,25 à 0,5 µm de large sur 2 à 4 µm de long) avec une partie renflée (le bulbe) et une partie plus allongée (le cou) arrivant jusqu'au conoïde. Ils contiennent les protéines RON localisées dans le cou qui jouent un rôle dans la formation de la jonction mobile lors de la pénétration du parasite dans la cellule hôte et les protéines ROP localisées dans le bulbe qui ont un rôle dans la virulence du parasite.
  - Micronèmes : ces organites en forme de bâtonnets renferment les protéines MIC qui permettent la fixation du toxoplasme sur la membrane plasmique avant la pénétration du parasite dans la cellule hôte.
  - Granules denses : ces organites sphériques de 200 nm de diamètre apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique. Au nombre d'une quinzaine par tachyzoïte et sont réparties dans le complexe apical mais aussi dans tout le cytoplasme. Les granules denses renferment les protéines GRA. A l'heure actuelle, on en dénombre 12. Elles ont un poids moléculaire compris entre 20 et 50 kDa et interviennent lors la formation de la vacuole parasitophore (VP) (Mercier et al. 2002).

I. 4. 3. Le complexe des membranes internes

Cet ensemble est constitué de vésicules aplaties très proches reliées par un réseau filamenteux (Mann and Beckers 2001). Associé à la membrane plasmique, cet ensemble constitue la pellicule (**Figure 5**). Ce complexe membranaire interne entoure le parasite à l'exception des 2 pôles.

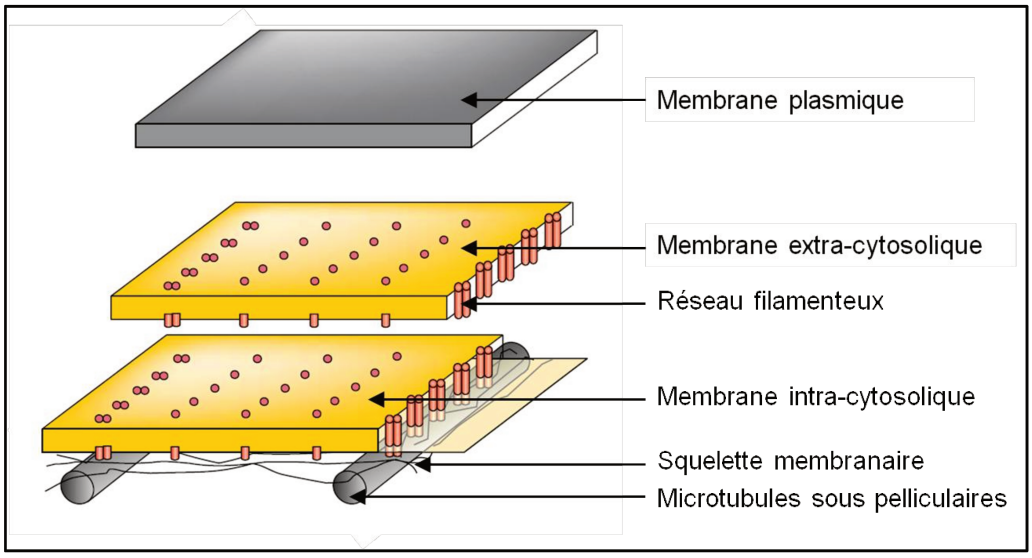


Figure 5 : Schématique de la structure de la pellicule de T. gondii.
D'après (Keeley and Soldati 2004)

I. 5. LES DIFFERENTES FORMES DE T. GONDII

T. gondii se retrouve sous 3 formes infectieuses différentes au cours de son cycle : les tachyzoïtes, les bradyzoïtes et les sporozoïtes (Dubey et al. 1998).

I. 5. 1. Le tachyzoïte

C'est la forme de multiplication rapide du parasite lors des phases actives de l'infection. Il se caractérise par une forme en croissant de 6 à 8 µm de long sur 3 à 4 µm de large. Son extrémité postérieure est arrondie tandis que son extrémité antérieure est plutôt effilée (**Figure 6**).

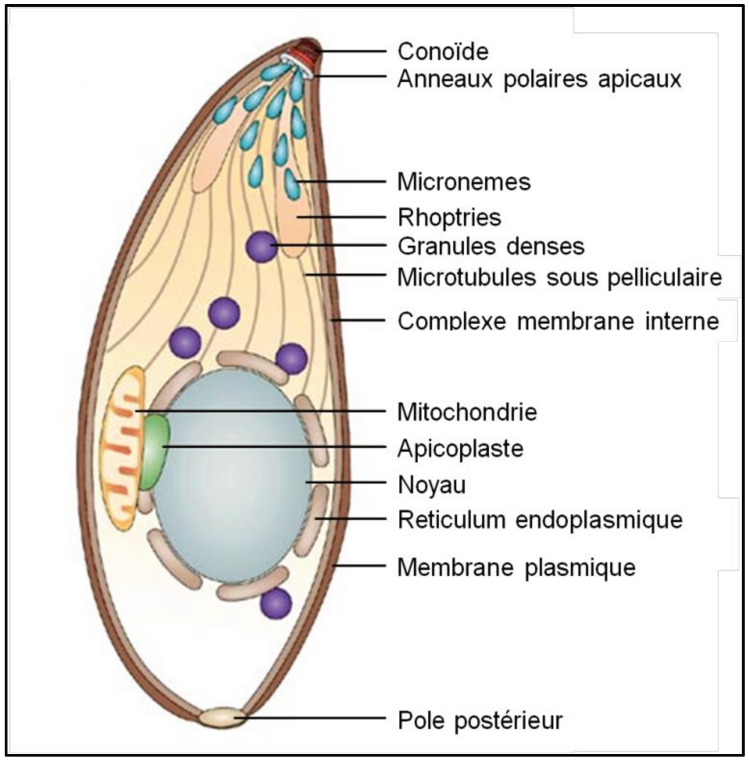


Figure 6 : Représentation schématique d'un tachyzoïte de T. gondii.
D'après (Baum et al. 2006)

Tous les types cellulaires sont susceptibles d'être infectés par les tachyzoïtes (Carruthers and Sibley 1997). Dans un premier temps, il y a reconnaissance des récepteurs de surface de la cellule-hôte grâce aux protéines antigéniques de surface SAG (Surface AntiGen) des tachyzoïtes. Puis ils s'attachent à la membrane de la cellule-hôte grâce à une interaction avec le 'glideosome' (Opitz and Soldati 2002) qui est un complexe moléculaire associé à la myosine MyoA se situant au niveau de la pellicule (**Figure 7**). Ce glideosome permet l'invasion cellulaire ainsi que les mouvements du parasite par 'glissement' (gliding) (Meissner et al. 2002).

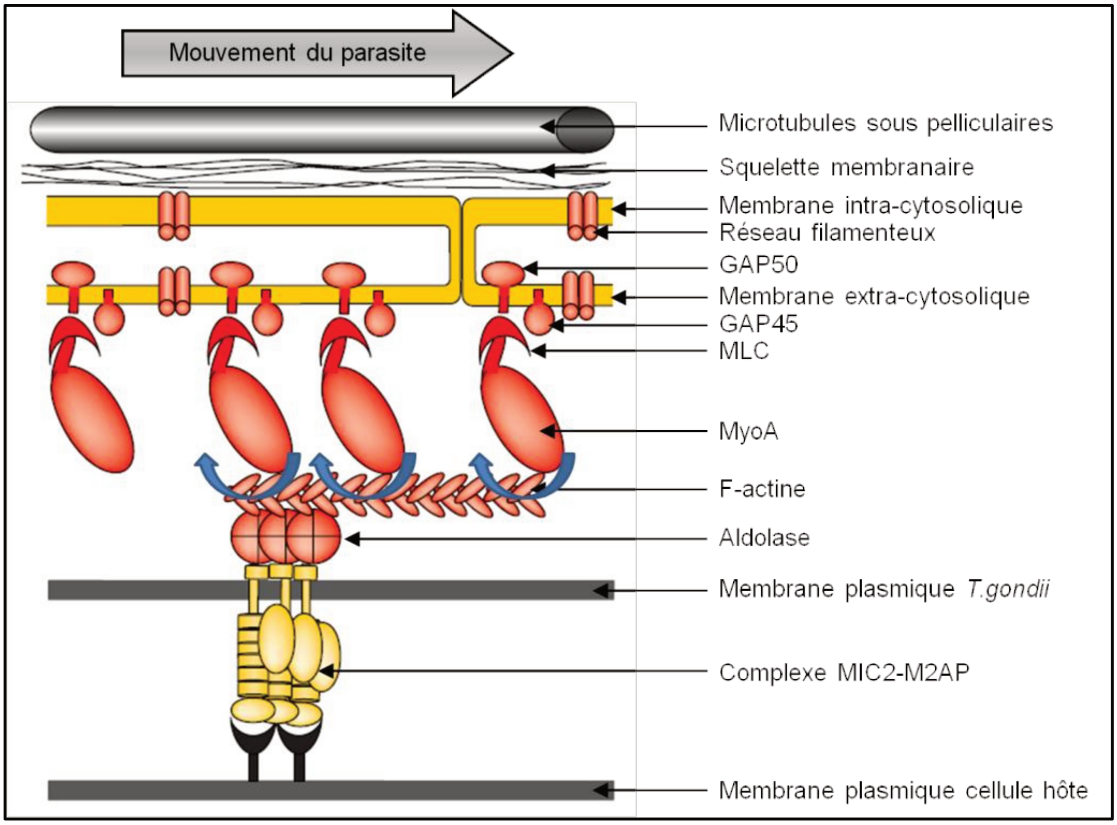


Figure 7 : Schéma du glideosome de T. gondii.
D'après (Keeley and Soldati 2004)

La pénétration du parasite dans la cellule-hôte est un phénomène actif et rapide qui ne dure pas plus de 20 secondes mais qui mobilise un grand nombre de protéines (**Figure 8**). La reconnaissance et l'attachement sur la cellule-hôte via les protéines SAGs induit un flux de calcium dans le tachyzoïte, provoquant l'accumulation des protéines MIC à sa surface, au niveau apical. Toujours sous ce flux de calcium, le conoïde est extrudé, ce qui permet la sécrétion des protéines RONs, issues du cou des rhoptries et AMA1, issue des micronèmes. Cette sécrétion permet la formation d'une 'jonction mobile' qui est un point de contact entre la membrane plasmique du parasite et celle de la cellule-hôte. La jonction mobile se forme tout autour du parasite et progresse au fur et à mesure de l'invasion du parasite dans la cellule-hôte. Elle est formée par un complexe entre une protéine du micromène (AMA1) et des protéines provenant du cou des rhoptries (RON2, RON4, RON5 et RON8). C'est le complexe AMA1/RON2 qui est rattaché à la membrane plasmique du parasite tandis que le complexe RON4/5/8 se fixe dans la membrane plasmique de la cellule-hôte (Straub et al. 2009). La membrane plasmique de la cellule-hôte s'invagine au fur et à mesure de la progression du parasite. Lorsque le parasite est totalement dans la cellule-hôte, la jonction mobile se referme en même temps que la membrane plasmique de la cellule-hôte qui se pince

et se détache. Dans le cytoplasme de la cellule-hôte, le parasite est protégé par une enveloppe composée principalement par la membrane plasmique de la cellule-hôte (Suss-Toby et al. 1996) : la vacuole parasitophore (VP) (**Figure 9**). La membrane de cette VP a une particularité car, issue de la membrane plasmique de la cellule-hôte, elle possède donc des lipides et des protéines à ancrage glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) mais est cependant dépourvue de protéines transmembranaires. Grâce à la jonction mobile qui joue un rôle de filtre moléculaire, la membrane de la VP est dépourvue des protéines intervenant dans le mécanisme de fusion endocytaire, évitant la fusion entre la VP et les lysosomes.

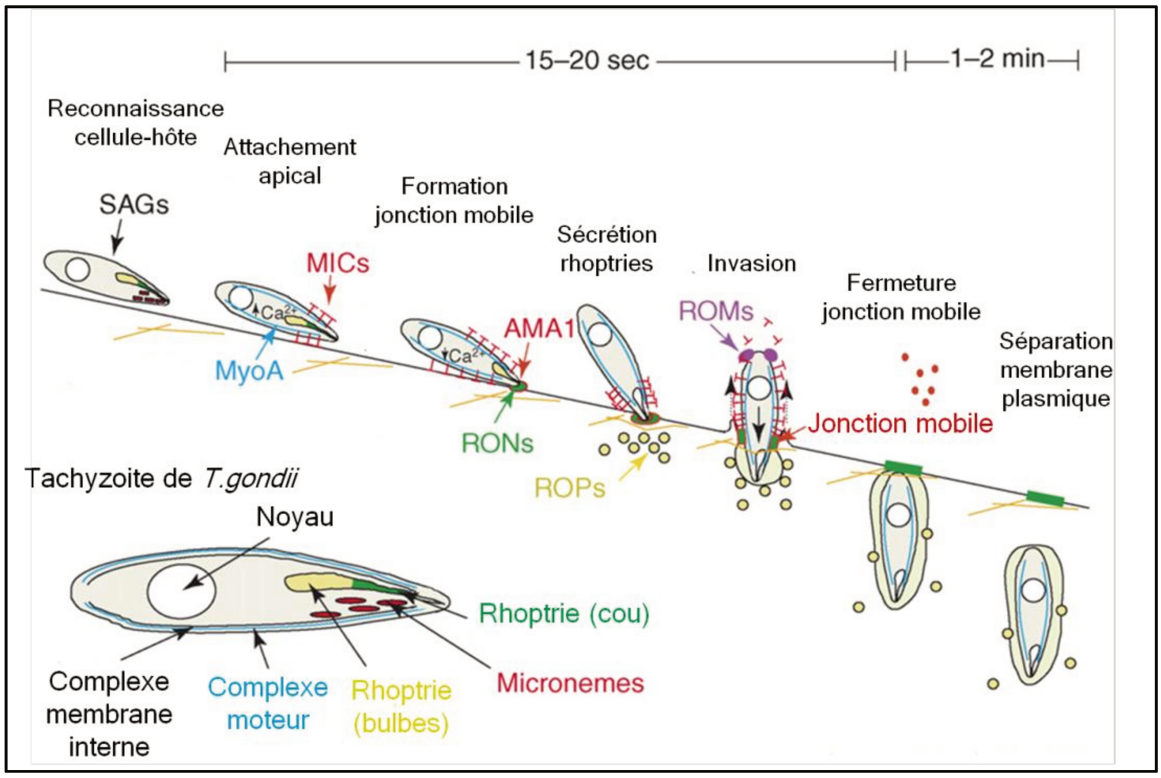


Figure 8 : Schéma de l'invasion d'une cellule par T. gondii.
D'après (Carruthers and Boothroyd 2007)

Figure 9 : 8 tachyzoïtes dans une vacuole parasitophore (VP).
Après 24h d'infection d'une cellule HFF1 par la souche RH (Stéphane SIMON).

La multiplication du tachyzoïtes par endodygénie commence 5 à 10 heures (selon les souches) après la pénétration dans la cellule-hôte (**Figure 10**). Dans un premier temps, il y a apparition de 2 complexes de membranes internes fils comprenant déjà un appareil de Golgi. Puis le noyau s'étend dans chacune des 2 cellules filles. Les organites sécrétoires se décomposent de la cellule mère et sont resynthétisés au niveau des cellules filles. La pellicule continue son développement autour des 2 cellules filles. Elles ne sont plus fusionnées qu'au niveau du corps résiduel de division qui contient les résidus des organites de la cellule mère.

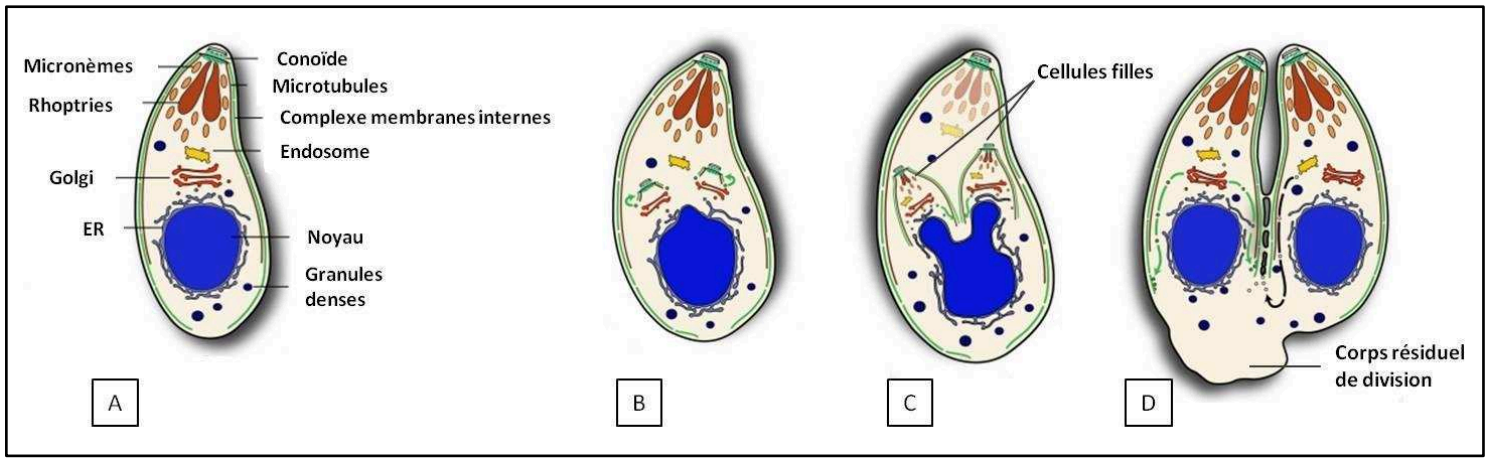


Figure 10 : Schéma de la multiplication des tachyzoïtes par endodygénie.
D'après (Agop-Nersesian et al. 2010)

Après plusieurs cycles, il y a lyse de la cellule-hôte et libération des tachyzoïtes permettant une infection des cellules voisines (**Figure 11**). Cependant, ce n'est pas la forme de transmission majeure. En effet, le tachyzoïte est très fragile. Il ne résiste pas dans le milieu extérieur, ni à la phase de digestion lors de l'ingestion orale (Dubey 1998).

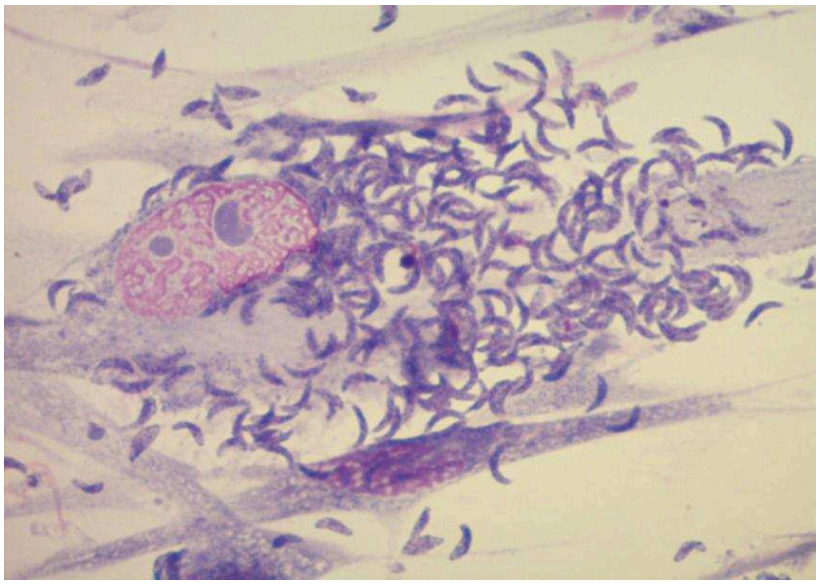


Figure 11 : Lyse de la cellule-hôte et libération des tachyzoïtes.
Après 96h d'infection d'une cellule HFF1 par la souche RH (Stéphane SIMON).

I. 5. 2. Le bradyzoïte

Le bradyzoïte est le stade quiescent du parasite (Tomavo 2001). Très proche du tachyzoïte, il se distingue notamment par un noyau plus postérieur et un plus grand nombre de micronèmes et d'amylopectine (**Figure 12**). Sa multiplication devient plus lente et la vacuole parasitophore se modifie pour présenter une enveloppe beaucoup plus résistante. Cette nouvelle structure constitue le kyste toxoplasmique. De forme sphérique, il mesure entre 10 et 200 µm et peut contenir des milliers de bradyzoïtes. Du fait de sa composition particulière rigide et épaisse, le kyste résiste aux traitements anti-toxoplasmiques actuels.

Ces kystes apparaissent entre 7 et 10 jours après l'infection. Ils peuvent se développer dans plusieurs types cellulaires mais persisterons préférentiellement dans les tissus musculaires et cérébraux. A la mort de la cellule hôte infectée, le kyste se rompt et libère les bradyzoïtes. Le système immunitaire élimine le plus grand nombre de bradyzoïtes, les autres réinfectent les cellules voisines. La persistance de ces kystes tout au long de la vie de l'hôte permet d'entretenir une immunité cellulaire et prévient en principe, une éventuelle réinfection (Dubey 1997) mais représente également une forme de dissémination et de contamination chez les carnivores. Cependant, en cas d'altération du système immunitaire (VIH,

chimiothérapie,…), les bradyzoïtes libérés dans l'hôte pourront se retransformer en tachyzoïtes à fort pouvoir pathogène.

Les kystes ayant une durée de vie assez longue, sont la source principale de contamination par ingestion de viande crue ou mal cuite. En effet, le bradyzoïte peut résister plusieurs jours à température ambiante et jusqu'à plusieurs semaines à +4°C. Il peut aussi survivre à la congélation jusqu'à 3 jours à -10°C et 2 jours à -20°C (El-Nawawi et al. 2008). Au contraire, la cuisson à plus de 67°C pendant quelques minutes suffit à détruire complètement les bradyzoïtes (Dubey et al. 1990).

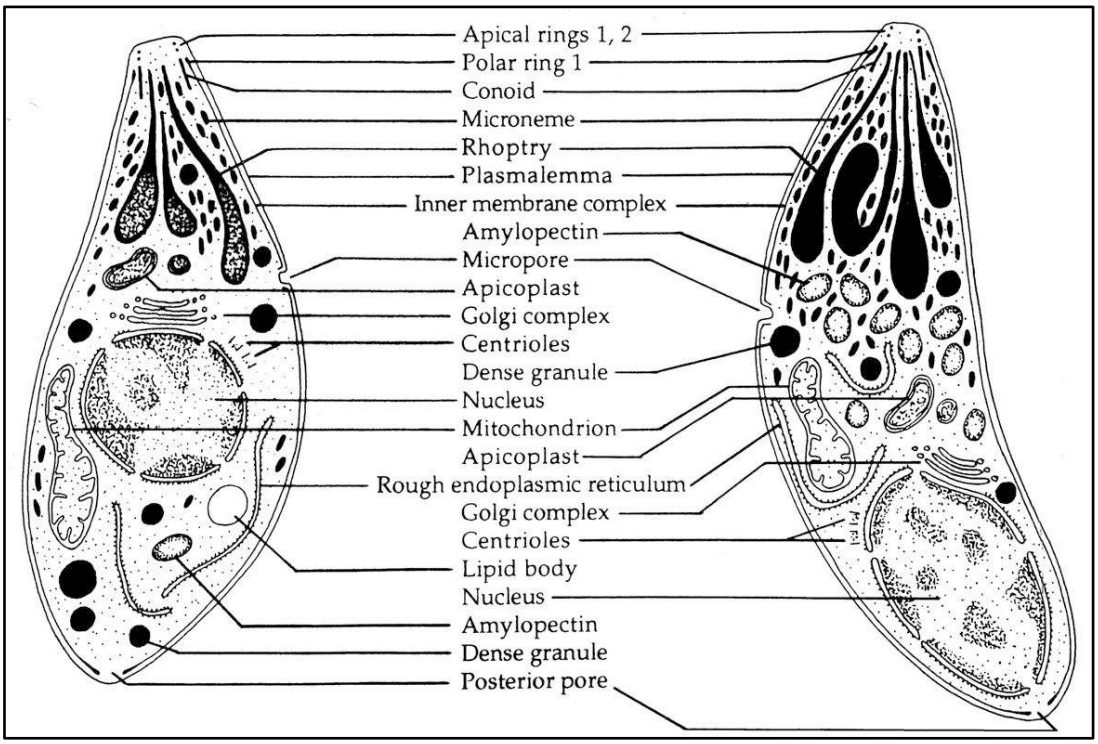


Figure 12 : Comparaison entre un tachyzoïte et un bradyzoïte.
D'après (Dubey et al. 1998)

Plusieurs facteurs entrent en jeu lors du processus de transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes, processus qui est réversible (**Figure 13**). L'élément principal pour la différentiation en bradyzoïte est une augmentation du pH en culture cellulaire (Skariah et al. 2010). Cependant, in vivo, c'est l'inhibition de l'activité mitochondriale liée à l'augmentation du TNF-α, IFN-γ et NO qui est à l'origine de cette conversion (Tomavo 2001).

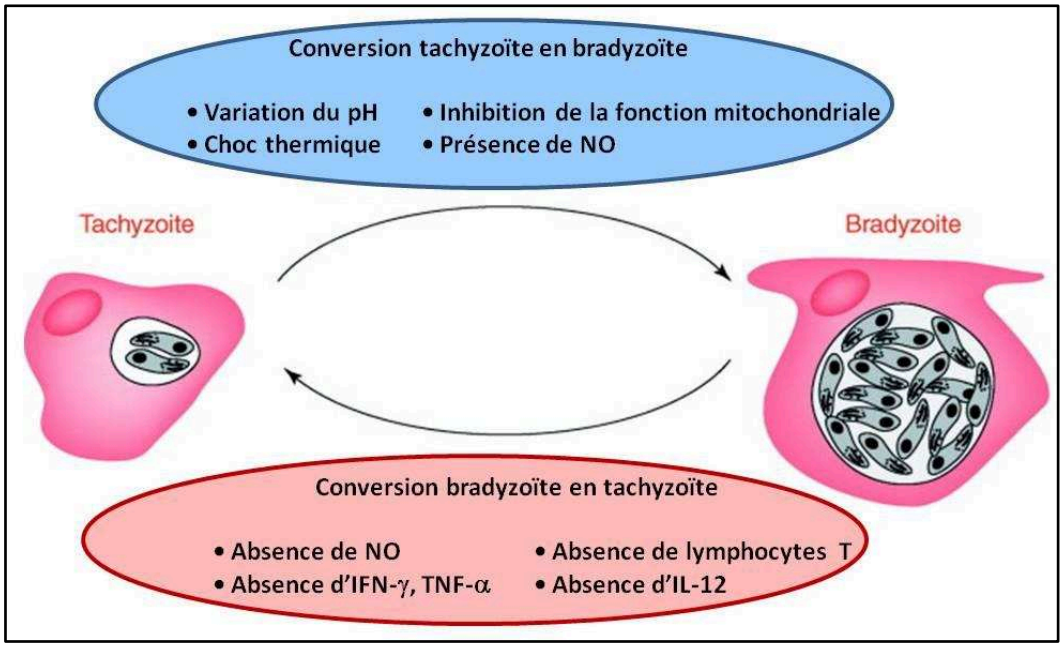


Figure 13 : Facteurs liés à l'interconversion entre tachyzoïtes et bradyzoïtes.
D'après (Lyons et al. 2002)

I. 5. 3. Le sporozoïte

Le sporozoïte est l'élément infectant à l'intérieur de l'oocyste sporulée. Lors de son excrétion par un félidé, l'oocyste non sporulé contient un élément unique : le sporoblaste (**Figure 14a**). Le sporoblaste se divise pour former 2 sporocystes (**Figure 14b**). Après sporogonie, chaque sporocyte va contenir 4 sporozoïtes (Dubey et al. 1998). Les sporozoïtes sont semblables aux autres formes infectantes et peuvent également infecter tous les types cellulaires (Tilley et al. 1997). C'est la forme de dissémination et de résistance principale du parasite. Plusieurs études ont montrées que le sporozoïte peut être infectant pendant plusieurs mois, voire des années suivant le milieu extérieur et la température. Les oocystes sont sensibles à la dessiccation et sont rapidement inactivés par la chaleur (10 min à 50°C.) (Dubey et al. 1970) ainsi qu'à la congélation (24h. à -21°C) (Frenkel and Dubey 1973). Ils peuvent cependant survivre dans l'eau à 4°C. pendant plus de 4 ans et près d'1 an et demi à 20-22°C. (Hutchison 1967). Dans des conditions naturelles, leur durée de survie diminue. Elle varie entre 2 mois et 1 an à une température comprise entre 15 et 30°C. (Frenkel et al. 1975).

Figure 14 : Oocystes de T. gondii. (a) non sporulé, (b) contenant 2 sporocystes.
(source : http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/gallery.html)

Le fait que les félidés enfouissent les fèces à quelques centimètres dans le sol permet ainsi de prolonger la survie des oocystes dans le milieu extérieur en le maintenant à l'humidité et à l'abri du soleil. Cet enfouissement est également propice à la dissémination. Ainsi, certains insectes (blattes) mais aussi les vers de terre peuvent être responsable de portage passif (Bettiol et al. 2000; Carruthers and Sibley 1997; Ruiz and Frenkel 1980; Wallace 1972). Les eaux de ruissellement issues des pluies contribuent également à la dissémination des oocystes qui peuvent aller jusqu'à la mer (Fayer et al. 2004; Simon et al. 2013) où l'oocyste résiste bien (Lindsay and Dubey 2009) et ainsi contaminer les mammifères marins (Mazzillo et al. 2013; Miller et al. 2004) et éventuellement les poissons (Zhang et al. 2014).

T. gondii a su développer une stratégie durant son cycle afin de pouvoir se transmettre et de se disséminer le plus efficacement possible, en développant une forme de multiplication rapide et dans tous type de cellules mais aussi une forme dormante et très résistante quelque soit dans le milieu et avec une plage de température importante. Ces capacités lui ont permis d'infecter une très grande partie des homéothermes à la surface de la planète.

I. 6. PREVALENCE

I. 6. 1. Chez l'homme

De façon globale, la séroprévalence est d'environ 30 à 40% de la population mondiale. Il y a cependant de grande disparité entre les différentes régions du monde en raison du climat et des modes de vie des populations. La prévalence des femmes enceintes ou en âge d'avoir des enfants (15- 45 ans) permet d'avoir une bonne représentation de la répartition de l'infection à Toxoplasma **(Figure 15)**. Si en Europe, la prévalence moyenne est entre 40 et 50 %, le nord est moins exposé puisque le taux chute à moins de 20 % pour les pays scandinaves. De même pour l'Amérique du Sud qui a une prévalence supérieure à 50 % (voire supérieur à 75 % pour le Costa Rica) alors que l'Amérique du Nord (Etats Unis et Canada) affiche des taux en dessous de 20 %. En Afrique, les prévalences les plus importantes se retrouvent autour du Golfe de Guinée (Cameroun, Nigeria et Togo) ainsi qu'à Madagascar avec des taux supérieurs à 75 %. L'Asie semble plutôt épargnée puisque la prévalence avoisine les 30 % (pour exemple : 23 % pour l'Australie, 11 % pour la Chine, 53 % pour l'Indonésie et 13% pour la Thaïlande). De façon générale, le taux de séroprévalence les plus élevés se situe au niveau de zones tropicales humides ou semi humides, propice à la survie des oocystes (Flegr et al. 2014).

En France, la séroprévalence des femmes en âge de procréer était en moyenne de 53,4 % en 1995, puis a diminué à 43,8 % en 2003 et à 36,7 % en 2010, remettant en cause la stratégie actuelle de dépistage. Il est toutefois fondamental de maintenir les mesures de précaution pendant la grossesse (Tourdjman et al. 2015).

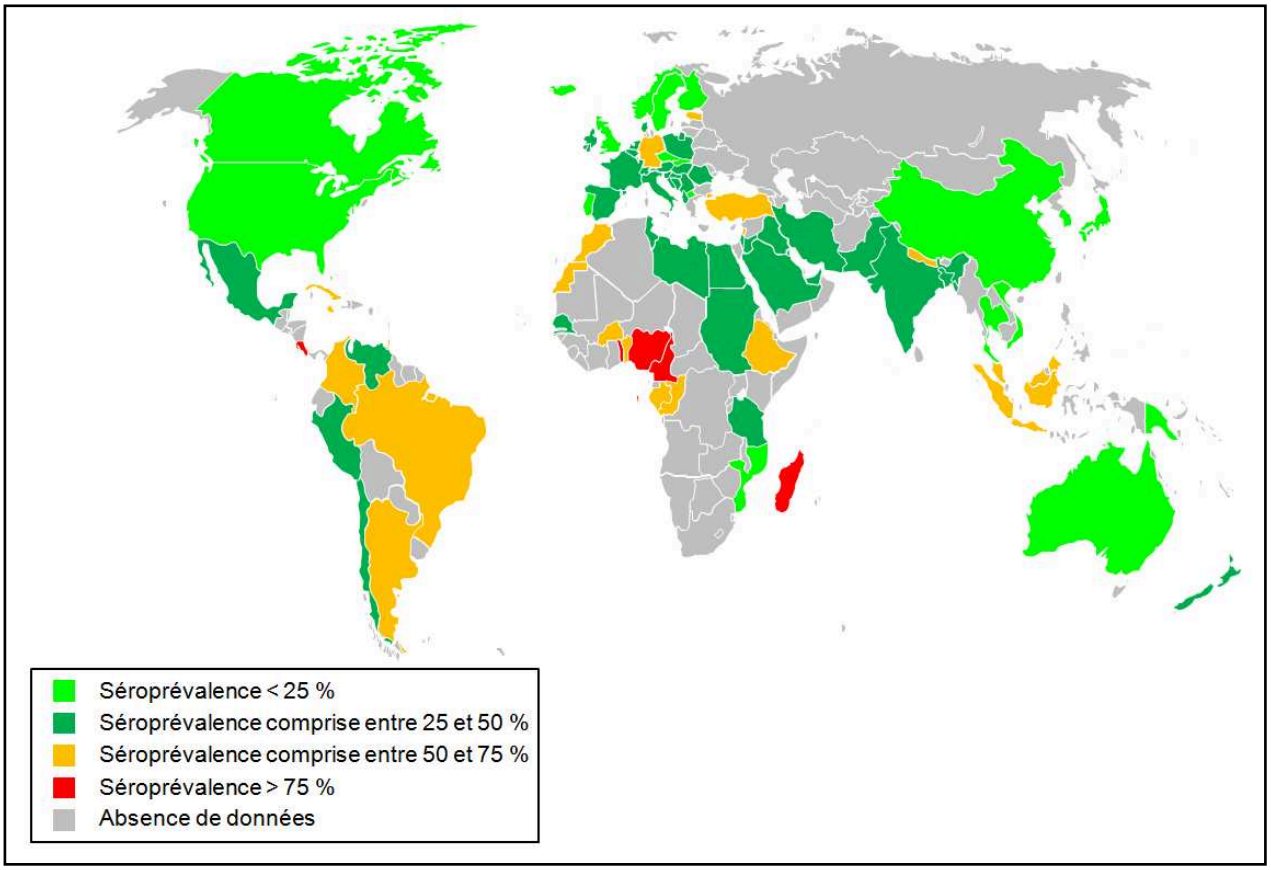


Figure 15 : Carte de séroprévalence chez les femmes en âge de procréer.
D'après (Flegr et al. 2014)

I. 6. 2. Chez les félidés

Les félidés domestiques ou sauvages étant les hôtes définitifs dans le cycle de T. gondii, ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de la dissémination de la maladie. La répartition des félidés à travers le monde diffère d'un pays à l'autre et donc la façon dont sont disséminés les oocystes de T. gondii. Un seul félidé peut excréter au total entre 3 et 810 millions d'oocystes pendant sa phase d'infection (Dabritz and Conrad 2010).

Ainsi, la population mondiale de félidés domestiques est estimée à environ 400 millions (Legay 1986). Si la séroprévalence globale chez les félidés domestiques est comprise entre 30 et 40 % (Elmore et al. 2010), elle est très variable en fonction des régions. On retrouve ainsi un taux assez faible au Japon ou en Italie (9 %) alors qu'il est beaucoup plus élevé au Mexique et avoisine les 71 % (Tenter et al. 2000). Chez les chats sauvages ou errants, la séroprévalence est presque identique. Elle est de 13 % en Corée et de 73 % au Brésil (Tenter et al. 2000).

Les félidés sauvages comptent près de 40 espèces (Wilson and Reeder 2005), répartis sur tous les continents à l'exception de l'Australie et de l'Antarctique. On les retrouve dans

des régions tropicales et subtropicales, des prairies, des savanes, des déserts arides ou dans les massifs himalayens. On ne connait cependant pas leur population exacte. La contamination de l'environnement sauvage est liée à la présence de ces félidés sauvages, maillon indispensable pour la dissémination des oocystes. Cette contamination est d'autant plus problématique lorsque le milieu sauvage côtoie le milieu anthropisé (ferme, élevage). La séroprévalence de ces félidés sauvages est généralement élevée et peut atteindre 100%. Sur 39 espèces, 31 ont été trouvés positives soit en sérologie soit en détection d'oocystes (Dubey 2010).

I. 6. 3. Chez les autres animaux

De nombreux autres mammifères dont les animaux d'élevage peuvent être porteurs de T. gondii. Ils représentent la plus grande source de contamination pour l'homme. Cependant, la séroprévalence varie en fonction des espèces et de leur localisation.

Porcs :

Pays	Séroprévalence (%)	Références
Slovaquie	1,1-3,5	(Turcekova et al. 2013)
Nouvelle Calédonie	2	(Roqueplo et al. 2011)
Lettonie	4,2	(Deksne and Kirjusina 2013)
Australie	4,3-6,7	(Steinparzer et al. 2015)
Chine	4,6-31,3	(Chang et al. 2013; Jiang et al. 2014; Wang et al. 2012; Wang et al. 2013b; Xu et al. 2014b)
Irlande	4,7	(Halova et al. 2013)
Japon	5,2	(Matsuo et al. 2014)
Portugal	7,1-9,8	(Esteves et al. 2014; Lopes et al. 2013)
Chili	8,8	(Munoz-Zanzi et al. 2012)
Népal	11,7	(Devleesschauwer et al. 2013)
Pologne	14,3-15,4	(Sroka et al. 2011)
Indonésie	14,6	(Ichikawa-Seki et al. 2015)
Mexique	17,2-53,3	(Alvarado-Esquivel et al. 2012a; Alvarado-Esquivel et al. 2014)
USA	17,7-90	(Dubey et al. 2012a; Hill et al. 2014)
Brésil	19,5-62,5	(Clementino Andrade et al. 2013; de Sousa et al. 2014; Feitosa et al. 2014)
Tibet	22,7	(Wu et al. 2012)
Roumanie	23,1	(Pastiu et al. 2013)
Nigéria	29,1	(Onyiche and Ademola 2015)
Colombie	30	(Franco-Hernandez et al. 2015)
Finlande	33	(Jokelainen et al. 2012)
Italie	57,1	(Bacci et al. 2015)
Espagne	58,2	(Hernandez et al. 2014)

Moutons :

Pays	Séroprévalence (%)	Références
Bresil	10-53,3	(Clementino Andrade et al. 2013; Correia et al. 2015; Cosendey-KezenLeite et al. 2014; Guimaraes et al. 2013)
Senegal	16	(Davoust et al. 2014)
Serbie	16	(Markovic et al. 2014)
Argentine	17,3	(Hecker et al. 2013)
Koweit	17,8	(Alazemi 2014)
Finlande	24,6	(Jokelainen et al. 2010)
Grece	28,3-53,7	(Diakoua et al. 2013; Kantzoura et al. 2013; Tzanidakis et al. 2012)
Mexique	29,9	(Alvarado-Esquivel et al. 2013a)
Iran	31-38	(Azizi et al. 2014; Sharif et al. 2015)
Ethiopie	31,6-37	(Gebremedhin et al. 2013a; Gebremedhin et al. 2013b)
Italie	33,3-59,3	(Cenci-Goga et al. 2013; Gazzonis et al. 2015)
Portugal	33,6	(Lopes et al. 2013)
Irlande	36	(Halova et al. 2013)
Arabie Saoudite	36,4	(Alanazi 2013)
Espagne	38,1-57,4	(Astorga et al. 2014; Diaz et al. 2014; Garcia-Bocanegra et al. 2013)
Tunisie	38,2-73,6	(Boughattas et al. 2014)
Caraibes	48-89	(Hamilton et al. 2014)
Ecosse	56,6	(Katzer et al. 2011)
Bangladesh	69,9	(Rahman et al. 2014)
Belgique	87,4	(Verhelst et al. 2014)
Turquie	97	(Leblebicier and Yildiz 2014)

Poulet :

Pays	Séroprévalence (%)	Références
Japon	0	(Matsuo et al. 2014)
Chine	4,1-5,8	(Wang et al. 2013c; Yang et al. 2012)
Mexique	6,9	(Alvarado-Esquivel et al. 2012b)
Irlande	18	(Halova et al. 2013)
Colombie	29,7	(Franco-Hernandez et al. 2015)
USA	43,6	(Dubey et al. 2015)
Iran	46,2-51,9	(Hamidinejat et al. 2014)
Egypte	68,8	(Barakat et al. 2012)

Ethiopie	70,7	(Gebremedhin et al. 2014)
Australie	90	(Chumpolbanchorn et al. 2013)

Chèvre :

Pays	Séroprévalence (%)	Références
USA (Missouri)	6,8	(Yaglom et al. 2014)
Chine	9	(Xu et al. 2014a)
Senegal	15	(Davoust et al. 2014)
Mexique	15,2	(Alvarado-Esquivel et al. 2013b)
Grece	16,8	(Kantzoura et al. 2013)
Bresil	18,1	(Santos Cde et al. 2012)
Portugal	18,5	(Lopes et al. 2013)
Tanzanie	19,3	(Swai and Kaaya 2013)
Arabie Saoudite	23,6	(Alanazi 2013)
Espagne	25,1	(Garcia-Bocanegra et al. 2013)
Iran	27	(Sharif et al. 2015)
Ethiopie	27,8	(Gebremedhin et al. 2013b)
Grece	30,7	(Tzanidakis et al. 2012)
Italie	41,7	(Gazzonis et al. 2015)
Bresil	43,3	(Clementino Andrade et al. 2013)
Roumanie	52,8	(Iovu et al. 2012)
Slovaquie	56,9	(Cobadiova et al. 2013)
Bangladesh	61	(Rahman et al. 2014)
Grece	61,3	(Diakoua et al. 2013)
Serbie	73,3	(Djokic et al. 2014)
Norvege	75	(Stormoen et al. 2012)

Bovins :

Pays	Séroprévalence (%)	Références
Chine	2,6-27,2	(Qiu et al. 2012; Sun et al. 2015; Zhou et al. 2012)
Pologne	3,2-14,6	(Holec-Gasior et al. 2013; Sroka et al. 2011)
Nouvelle Calédonie	3,3	(Roqueplo et al. 2011)
Japon	7,3	(Matsuo et al. 2014)
Indonésie	7,4	(Ichikawa-Seki et al. 2015)
Portugal	7,5	(Lopes et al. 2013)
France	7,8	(Gilot-Fromont et al. 2009)
Iran	8,6-18,1	(Azizi et al. 2014; Sarvi et al. 2015)
Nigeria	13,9	(Onyiche and Ademola 2015)
Pakistan	15,2-19,8	(Ahmad and Qayyum 2014)
Brésil	17,4-27,2	(Santos et al. 2013)

Thaïlande	25,7	(Wiengcharoen et al. 2012)
Bangladesh	27	(Rahman et al. 2014)
Colombie	35	(Franco-Hernandez et al. 2015)
Soudan	44,8	(Elfahal et al. 2013)
Espagne	83,3	(Garcia-Bocanegra et al. 2013)

Les oiseaux peuvent également être considérés comme un 'réservoir' important d'hôtes intermédiaires. Ils constituent une source potentielle de contamination pour les félidés domestiques ou sauvages. Comme les poulets, les oiseaux se nourrissant sur le sol peuvent jouer un rôle dans la surveillance de la contamination tellurique (Ruiz and Frenkel 1980). Une récente étude estime que les félidés se nourrissent de plusieurs milliards d'oiseaux par an (Loss et al. 2013). De plus, T. gondii peut être aussi responsable d'une mortalité importante chez les oiseaux (Dubey 2010; Dubey 2002; Work et al. 2015). En zone tropicale, la séroprévalence des oiseaux sauvages est en moyenne de 36 % suivant les espèces. Mais la séroprévalence des espèces vivant plutôt au niveau du sol augmente jusqu'à 77 % (Gennari et al. 2014).

D'autre part, la persistance des oocystes dans l'eau de mer permet la contamination des mammifères marins dans plusieurs parties du monde : Amérique du nord (Simeone et al. 2015), Amérique du sud (Deem et al. 2010; Esmerini et al. 2010), Angleterre (Forman et al. 2009) Australie (Lynch et al. 2011) et même dans les zones polaires (Michael et al. 2016). Cela a pour conséquence, la contamination par T. gondii de population en zone polaire (Goyette et al. 2014) où la présence de félidés est quasi nulle avec une séroprévalence qui atteint près de 60 % chez les Inuits de Nunavik (Messier et al. 2009). La consommation de viande de phoque mal cuite a été mise en évidence comme facteur de risque (Tryland et al. 2014).

I. 7. FORMES CLINIQUES

I. 7. 1. Forme asymptomatique

Il s'agit de la forme la plus couramment rencontrée chez les sujets immunocompétents dans les pays Européen et dans le Nord de l'Amérique (80 % des cas). Elle se traduit par une séroconversion sans autre signe biologique. Après pénétration dans l'organisme (souvent par ingestion), le parasite se retrouve dans le sang et migre principalement au niveau des muscles et du cerveau puis va s'enkyster. Ces kystes ne vont

provoquer aucune trouble inflammatoire. Ils vont persister longtemps dans l'organisme de l'hôte, provoquant une réaction immunitaire faible mais prolongée.

I. 7. 2. Forme symptomatique 'ganglionnaire'

On la retrouve dans environ 15 à 20 % des cas chez les sujets immunocompétents. Cette forme est caractérisée par l'apparition de ganglions souvent localisés au niveau du cou. Elle est associée à une fièvre modérée et une asthénie. Sans traitement, ces symptômes peuvent perdurer plusieurs semaines avant de disparaitre. De la même manière que dans la forme asymptomatique, on notera une séroconversion et la persistance du parasite sous forme de kystes entrainant une immunité.

I. 7. 3. Forme congénitale

La contamination du fœtus se fait par transmission fœto-maternel. La mère, non immunisée, est contaminée durant la grossesse et le parasite passe la barrière placentaire (McAuley 2014). Dans de rares cas, la transmission peut également se produire lors d'une reviviscence parasitaire chez une femme enceinte immunodéprimé (réactivation). Le risque de transmission est très faible lors du 1er trimestre de grossesse (environ 5% des cas) et augmente progressivement jusqu'au 3eme trimestre (près de 80 % des cas). Cependant, la gravité de l'infection fœtale évolue à l'inverse (**Figure 16**). Lors de l'infection au 1er trimestre, dans une grande majorité des cas, une forme sévère se développe avec de graves séquelles cérébrales et multi-viscérales (Gay-Andrieu et al. 2003) allant jusqu'à la mort in utéro. Au 3eme trimestre, les infections n'entrainent généralement qu'une forme infra-clinique correspondant à une séroconversion de l'enfant prouvant qu'il a été en contact avec le parasite. La principale complication est l'apparition d'une choriorétinite (inflammation de la choroïde associée à une atteinte de la rétine) à l'enfance, l'adolescence ou à l'âge adulte (Dunn et al. 1999).

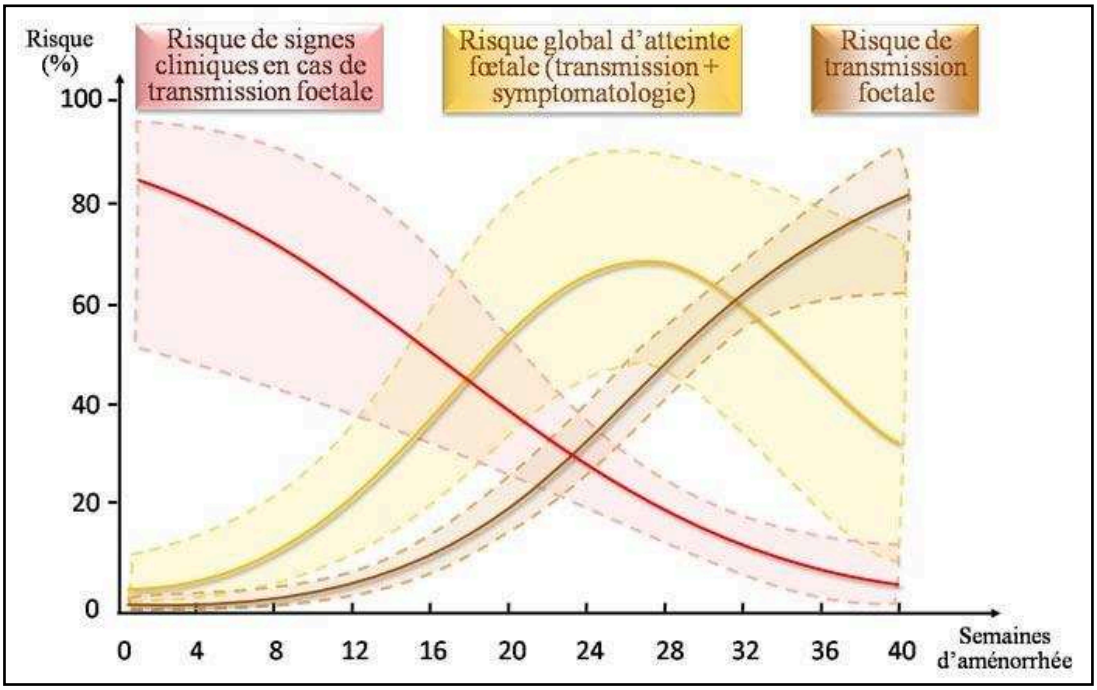


Figure 16 : Risques de contamination congénitale.
D'après (Dunn et al. 1999)

I. 7. 4. Toxoplasmose oculaire

Cette forme de toxoplasmose a longtemps été reconnue pour être la conséquence principale d'une toxoplasmose congénitale. Cependant, des études récentes tendent à démontrer que, dans de nombreux cas, les manifestations oculaires chez des sujets immunocompétents sont liées à une infection acquise (Ozgonul and Besirli 2016; Pleyer et al. 2014). En Amérique du Sud, la toxoplasmose oculaire représente un réel problème de santé publique (de-la-Torre et al. 2007; Maenz et al. 2014)

Cependant, d'autres facteurs doivent être pris en compte dans le développement de cette forme oculaire comme la diversité génétique du parasite (Fernandez et al. 2016) décrite depuis le début des années 2000.

I. 7. 5. Toxoplasmose chez le sujet immunodéprimé

En cas d'immunodépression, le toxoplasme peut provoquer des infections opportunistes graves. En raison de la perte du système immunitaire, il y a alors réactivation d'une infection latente (Basavaraju 2016) essentiellement dû à la réactivation des kystes cérébraux. La perte de la pression immunitaire sur les kystes peut être due à une infection par le VIH ou lors d'une thérapie immunosuppressive (Robert-Gangneux et al. 2015) entrainant une toxoplasmose oculaire, une toxoplasmose cérébrale (Pereira-Chioccola et al. 2009; Pott and Castelo 2013) ou une toxoplasmose disséminée impliquant tous les organes mais

essentiellement les poumons (Velasquez et al. 2016), le cœur (Lanjewar et al. 2006) et le cerveau (Ajzenberg et al. 2016).

I. 7. 6. Toxoplasmose 'atypique'

Depuis plusieurs années, des formes atypiques de Toxoplasma (non-type I, non-type II et non-type III) ont été décrites principalement dans l'environnement ou chez les animaux. Cependant, des cas de toxoplasmoses impliquant ces souches atypiques chez des sujets immunocompétents ou non, ont également été rapportés (Silveira et al. 2015; Sobanski et al. 2013). Ces souches atypiques ont des manifestations cliniques plus virulentes que les souches clonales (Boughattas et al. 2011; Delhaes et al. 2010; Demar et al. 2012).

I. 8. BIODIVERSITE GENETIQUE

I. 8. 1. Marqueurs génétiques

Les souches de T. gondii ont été génotypées à partir des années 90 grâce à plusieurs alloenzymes (Darde et al. 1988; Darde et al. 1992). Cette technique utilisait seulement 6 enzymes (l'aspartateamino transférase (ASAT), la glutathion réductase (GSR), la glucose phosphate isomérase (GPI), l'amylase (AMY), la phosphatase acide (ACP) et la propionyl estérase (PE)) sur les 39 étudiées pour avoir un profil électrophorétique discriminant. Cependant, cette technique a aussi les inconvénients d'utiliser un grand nombre de parasites, pas toujours facile à obtenir en fonction de la virulence de certaines souches et de ne pas détecter les mutations silencieuses sur la séquence en nucléotidique (mais qui n'ont pas de répercussions sur la séquence protéique). Ainsi, des profils électrophorétiques identiques pouvaient avoir des profils génétiques différents.

Avec l'apparition des Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), une nouvelle classification des souches est apparue. Les SNPs sont des variations d'un nucléotide à une position donné sur le génome, entre individus de la même espèce, avec une fréquence > 1%. Les SNPs se retrouvent fréquemment puisque le taux est estimé à environ 1 pour 2000 paire de base (pb) sur le génome humain (Barreiro et al. 2008; Nachman 2001; Sachidanandam et al. 2001). Ce taux, plus faible chez T. gondii, serait d'environ 1 pour 900 pb (Bontell et al. 2009). Ce polymorphisme génétique peut permettre l'apparition ou la disparition de site de reconnaissance pour des enzymes de restriction. La technique de PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) permet l'étude de ces sites de restriction. La première classification effectuée avec cette technique s'est basée sur 6 marqueurs génétiques.

L'échantillonnage était composé des souches déjà étudiées par des laboratoires (RH, M7741, C56, ME49, Prugniaud) et de souches isolées de cas de toxoplasmose humaines en Europe et en Amérique du Nord. L'étude a conclu à l'existence de 3 lignées clonales : type I, type II et type III (Howe and Sibley 1995).

Type I : Il est très rarement isolé. La souche la plus étudiée est la souche RH et fait office de référence dans la plupart des expérimentations. Elle a été isolée en 1939 lors d'une encéphalite aigüe humaine (Sabin 1941). D'autres souches ont, par la suite, été isolées à partir d'animaux ou de patients (assez rare) (Ajzenberg et al. 2010) et conservent le même profil de virulence chez la souris comme GT1 et VEL (Howe and Sibley 1995).

Type II : C'est le génotype le plus fréquemment isolé (80%) en Europe et en Amérique du Nord. Elles sont à l'origine de la plupart des infections chez l'homme et les animaux domestiques (Gross et al. 1997). En France, elles sont responsables de la grande majorité des cas de toxoplasmose congénitale ou occulaire (Ajzenberg et al. 2002; Fekkar et al. 2011). Les souches les plus étudiées sont ME49, Prugniaud (PRU) ou 76K.

Type III : C'est un génotype rencontré surtout chez les animaux et plus rarement dans les infections humaines en fonctions de leur origine géographique.

Par la suite, le séquençage a permis la détection de nombreux autres SNPs situés sur différents gènes codant pour des protéines :

- de fonctions connues comme les antigènes de surface, les granules denses ou les rhoptries du parasite (Grigg et al. 2001; Tinti et al. 2003). D'autres gènes codants pour protéines 'fonctionnelles' (β-tubuline, ADN polymérase α, dihydrofolate réductase ou la thymidilate synthétase) sont également utilisés (Grigg and Boothroyd 2001; Sibley and Boothroyd 1992)

- ou de fonctions encore inconnues comme 850, 950, L328 et B1(Grigg and Boothroyd 2001; Sibley and Boothroyd 1992).

Au début des années 2000, une nouvelle étude a permis d'identifier 200 nouveaux marqueurs SNPs en plus des 50 déjà connus (Khan et al. 2005). Bien que le séquençage de plusieurs locus (MLSP pour Multi Locus Sequence Typing) reste une référence pour un typage optimal des souches, sa mise en place fastidieuse et son coût élevé sont des obstacles à une utilisation pour des études épidémiologiques. Elle permet de désigner des haplogroupes

par l'utilisation de 8 introns de 5 loci : UPRT (introns 1 et 7), MIC2 (introns 1 et 3), BTUB (introns 1 et 2), EF1 (intron 1) et HP (intron 2) (Su et al., 2012).

La PCR-RFLP de gène à copie unique, plus facile d'utilisation, ne permet cependant pas de détecter des SNPs en dehors des sites de restriction. L'utilisation de plusieurs marqueurs est donc nécessaire pour un génotypage résolutif. A l'heure actuelle, 9 à 12 marqueurs sont couramment utilisés pour génotyper les souches de T. gondii à travers le monde (Casagrande et al. 2015; Ruffolo et al. 2016; Su et al. 2006b). En général, l'utilisation de 10 marqueurs (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 et Apico) permet de désigner des génotypes «ToxoDB PCR-RFLP #» suivi d'un nombre spécifique. Une liste de 231 génotypes est actuellement référencée dans une base de données (http://toxodb.org/toxo/showQuestion.do?questionFullName=RflpIsolateQuestions.ByGenotypeNumber).

I. 8. 2. Analyse des microsatellites

Le séquençage de marqueurs génétiques plus fins permet de différencier des génotypes différents de T. gondii. C'est le cas des microsatellites (MS) ou 'Short Tandem Repeats' (STR) qui sont des fragments d'ADN dont la séquence est très courte (de 1 à 6 nucléotides) et se répètent en tandem jusqu'à plusieurs dizaines de fois. Cette répétition peut être due aux erreurs que peut faire l'ADN polymérase lors de la réplication. Plus le nombre de répétition est important, plus ce risque d'erreur est élevé. Bien que polymorphes à travers un processus évolutif, les microsatellites sont généralement hérités de manière stable entre des individus étroitement liés. Ces propriétés ont conduit à leur utilisation dans les études sur la diversité de la structure de la population et dans la détermination de la lignée et de la clonalité chez plusieurs Apicomplexa : Cryptosporidium parvum (Quilez et al. 2011), Plasmodium falciparum (Murray et al. 2016; Salgueiro et al. 2016), Neospora caninum (Regidor-Cerrillo et al. 2013; Salehi et al. 2015) ou Babesia bovis (Combrink et al. 2014).

Chez T. gondii, les premières études ont débuté avec 5 marqueurs : TUB2, W35, TgM-A, B18 et B17 (Ajzenberg et al. 2005; Demar et al. 2008) (**Tableau 1**). Par la suite, 3 nouveaux marqueurs ont été décrits : M33 (Blackston et al. 2001), IV.1 et XI.1 (Ajzenberg et al. 2010) (**Tableau 1**). Ces marqueurs ont des motifs relativement stables $(TG)_n$ ou $(TC)_n$ donnant une discrimination modérée permettant cependant une différentiation entre les lignées clonales. Un plus fort pouvoir discriminant est apportée par l'utilisation de marqueurs microsatellites plus polymorphes dit de 'fingerprinting' (empreinte digitale). Ces marqueurs sont constitué d'un motif $(TA)_n$: N60, N82, AA, N61, N83 (Ajzenberg et al. 2002), M48 et

M102 (Blackston et al. 2001) (**Tableau 1**). La combinaison des8 marqueurs de typage et des 7 marqueurs d'empreintes digitales permet d'atteindre un fort pouvoir discriminant permettant le typage quasi individuel des clones.

Tableau 1 : Marqueurs microsatellites pour le typage de T. gondii.
D'après (Ajzenberg et al. 2010)

Microsatellite	Discrimination	Fonction	Chromosome (Position)
TUB-2	Modérée	β-tubuline	IX (974608 à 974896)
W35	Modérée	Inconnue	II (633241 à 633482)
TgM-A	Modérée	Myosine A	X (4824879 à 4825083)
B18	Modérée	Inconnue	VII (2921536 à 2921693)
B17	Modérée	Inconnue	XII (6474746 à 6475079)
M33	Modérée	Inconnue	IV (672591 à 672760)
IV.1	Modérée	Inconnue	IV (742419 à 742693)
XI.1	Modérée	Inconnue	XI (189702 à 190058)
N60	Forte	Inconnue	Ib (1766079 à 1766221)
N82	Forte	Inconnue	XII(1621472 à 1621585)
AA	Forte	Inconnue	VIII (5836880 à 5837144)
N61	Forte	Inconnue	VIIb (4217145 à 4217238)
N83	Forte	Inconnue	X (1772898 à 1773209)
M48	Forte	Inconnue	Ia (332951 à 333166)
M102	Forte	Inconnue	VIIa (3093491 à 3093664)

I. 8. 3. Classification

Les premières études ont montré que la majorité des souches isolées en Europe et en Amérique du Nord appartiennent aux 3 souches clonales I, II et III. Ces lignées sont bien implantées et se sont adaptées à l'homme ainsi qu'aux animaux domestiques et d'élevage (chat, volaille, porc, moutons…) qui sont les vecteurs de la contamination chez l'homme. La variation génétique entre ces lignées varie peu (entre 1 et 3 %) et la variation au sein d'un même lignage est très faible (<0.01%) (Ajioka 1998).Le taux de recombinaison génétique pour T. gondii est donc particulièrement bas pour un organisme à reproduction sexué. Il est pourtant suffisant pour provoquer des transferts génétiques occasionnels entre les trois principales lignées.

En effet, des analyses génétiques plus fines (PCR-RFLP ou microsatellites) ont mis en lumière d'autres clones n'appartenant pas dans une des 3 lignées clonales. Si une majorité des souches typées entrent dans un des 3 génotypes, il existe également des souches avec un génotype particulier. Ces clones présentent une recombinaison des allèles classiques I, II ou III (Bontell et al. 2009; Grigg et al. 2001). 4 clones recombinants étaient d'ailleurs déjà présents lors l'étude de Howe et Sibley (1995), présentant un mélange de type I, II ou III dans leurs génotype. Ces souches recombinantes prouvent l'existence d'une sexualité de T. gondii chez les félidés. Elles sont cependant minoritaires pour pouvoir modifier la structure clonale de ce parasite (Ajzenberg et al. 2005). En parallèle de ces souches clonales et de ces souches recombinantes, certaines souches présentent des allèles uniques (atypiques), non retrouvés parmi les allèles des 3 génotypes majeurs (Ajzenberg et al. 2004; Carme et al. 2002). En 2013, le typage a permis de classer 1457 échantillons en 189 génotypes révélant la diversité génétique de T. gondii, géographiquement (**Figure 17**). Ainsi, il existe un contraste entre l'Amérique centrale et du Sud et les autres continents. Dans la plupart des régions, il existe plusieurs génotypes avec une prédominance de quelques uns. En Amérique du Nord, 40 génotypes ont été détectés avec une dominance des génotypes ToxoDB PCR-RFLP #1, 2, 3, 4 et 5. En Europe, 9 génotypes cohabitent avec une dominance des génotypes #1, 2 et 3, en Asie, on retrouve 10 génotypes avec une dominance des génotypes #9 et 10 et en Afrique, 13 génotypes identifiés avec une dominance des génotypes #2 et 3. En Amérique Centrale et du Sud, se sont 156 génotypes qui ont été détectés sans aucune prédominance. On constate également que les génotypes #10 (type I), 1 (type II) et 2 (type III) sont très peu représentés (Shwab et al. 2014).

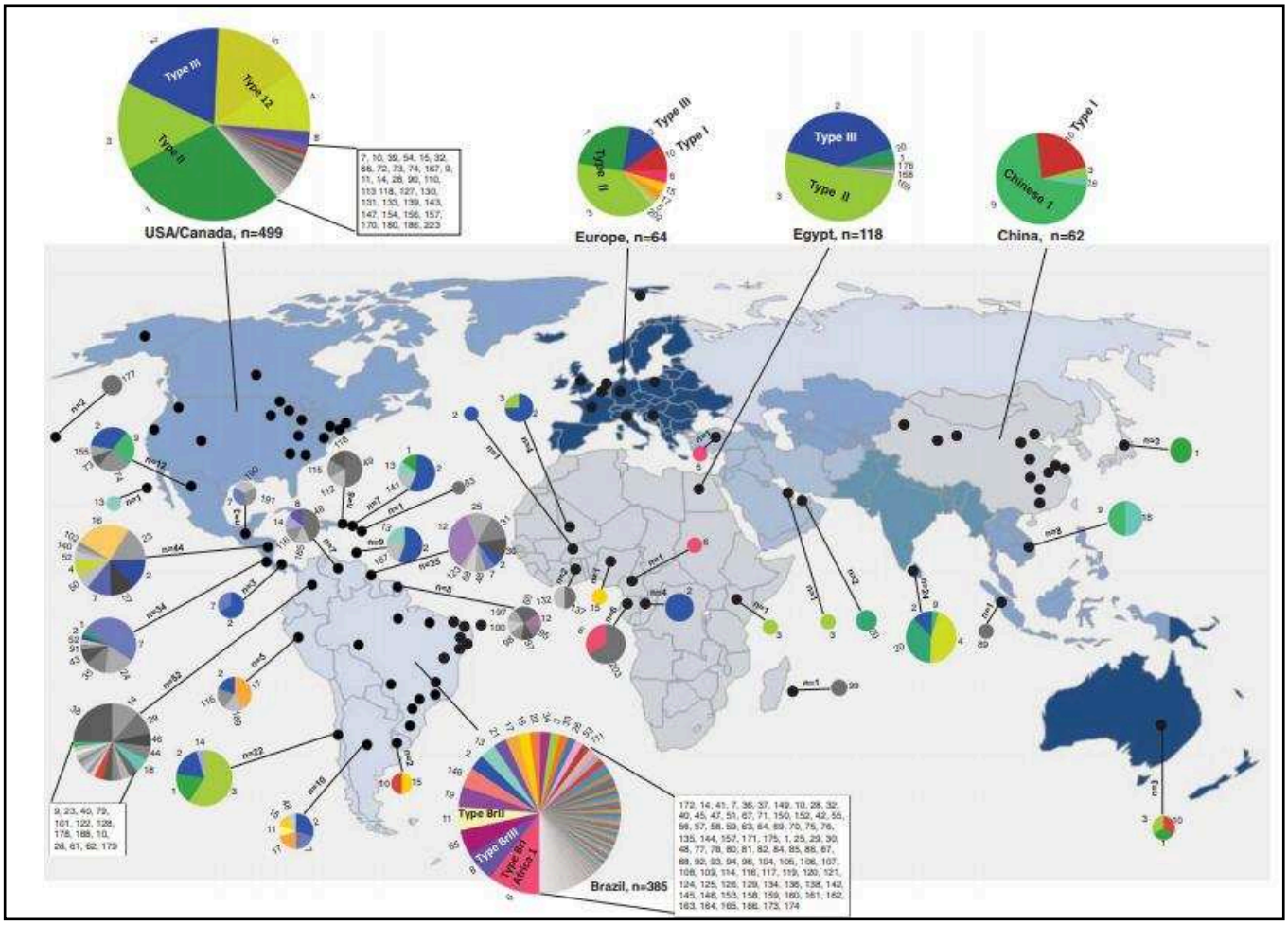


Figure 17 : Distribution géographique des génotypes de T. gondii
D'après (Shwab et al. 2014)

L'analyse de SNP de 8 introns sur 5 gènes différents a permis une classification des souches clonales et de nombreux isolats atypiques provenant d'Amérique du Sud. Cette première classification a répartie les souches en 12 haplogroupes (Hg), les lignées clonales étant désignées haplogroupe 1, 2 et 3. Une 4^{e} lignée clonale (Hg 12) a également été identifiée en Amérique du Nord, où elle se retrouve couramment dans la faune sauvage (Dubey et al. 2011b; Khan et al. 2011). Par la suite, 2 nouveaux haplogroupes ont complété cette classification. Cette analyse indique que les 14 HG peuvent avoir dérivé d'un mélange de 6 souches ancestrales (Khan et al. 2011). La combinaison plusieurs méthodes de génotypage sur un nombre élevé d'échantillons a permis d'affiner cette classification. Les 15 haplogroupes (représentant 138 génotypes sur 950 échantillons) ont été regroupés en 6 clades (A à F) majeurs regroupant les haplogroupes apparentés (Su et al. 2012). Les clades A, B et F montrent plusieurs sous ensemble composés d'haplogroupes distincts. Ainsi, le clade A représente un groupe assez important avec les haplogroupes décrits en Afrique (Hg 6 et 14) (Khan et al. 2011; Mercier et al. 2010), en Amérique du Sud (Hg 6) (Khan et al. 2007) et en

Amérique du Nord (Hg1) (Howe and Sibley 1995). Le clade B comprend les haplogroupes 4 et 8 qui sont retrouvé en Amérique du Sud lors de toxoplasmose oculaire (Khan et al. 2006). Le clade F est, quant à lui, beaucoup plus diversifié génétiquement puisqu'il comprend des souches isolées provenant d'Amérique du Sud et plus précisément de la Guyane Française (Hg 5 et 10) (Mercier et al. 2011) ainsi que du Brésil. Le clade D présente un plus haut niveau de divergence par rapport aux autres groupes et est composé de 2 haplogroupes (Hg 2 et Hg 12). Enfin, 2 clades sont représentés par des haplogroupes uniques : le clade C (Hg 3) et le clade E (Hg 9). Un seizième haplogroupe a été ajouté à la suite de l'analyse sur les SNPs du génome regroupant certaines souches des Hg 4 et 8 (Lorenzi et al. 2016).

I. 8. 4. Evolution des souches

Malgré des divergences génétiques, les lignées clonales (type I, II et III) montrent un degré de similitude assez important indiquant la possible existence d'un ancêtre commun il y a environ 10.000 ans (Su et al. 2003). La comparaison des SNP à l'échelle du génome des souches de lignées clonales a permis de déterminer que l'ancêtre du type II dite II* a croisé les souches ancestrales α et β, il y a environ 10 000 ans pour générer les types I et III que l'on connait. Ces 3 souches se retrouvent fréquemment isolées en Europe et en Amérique du Nord, suggérant qu'elles se sont propagées rapidement depuis leur récente création (Boyle et al. 2006). N'ayant pas engendré d'autre descendance aussi prolifique, l'explication serait que la recombinaison a réuni une combinaison procurant un avantage sélectif à ces 3 lignées (Grigg et al. 2001). En effet, ces lignées partagent une version monomorphe du chromosome 1a (Chr1a), contrairement à la variabilité génétique caractérisant tous les autres chromosomes (Khan et al. 2006). En revanche, on observe un modèle entièrement différent pour les souches atypiques présence en Amérique du Sud qui montrent une diversité et une divergence nettement plus grande, ce qui pourrait indiquer une évolution beaucoup plus lointaine, de l'ordre de 1.000.000 d'années (Sibley and Ajioka 2008; Su et al. 2003) (**Figure 18**). L'analyse du Chr1a de ces souches atypiques d'Amérique du Sud a montré une similitude génétique très importante avec les lignées clonales (Lehmann et al. 2006). Cependant, la distribution de Chr1a dans des souches sauvages et anthropisées de T. gondii collectées en Amérique du Sud et plus précisément en Guyane Française atteste de la version quasi monomorphique de Chr1a dans les souches d'environnements anthropisées alors qu'il est extrêmement diversifié dans les souches sauvages (Khan et al. 2014).

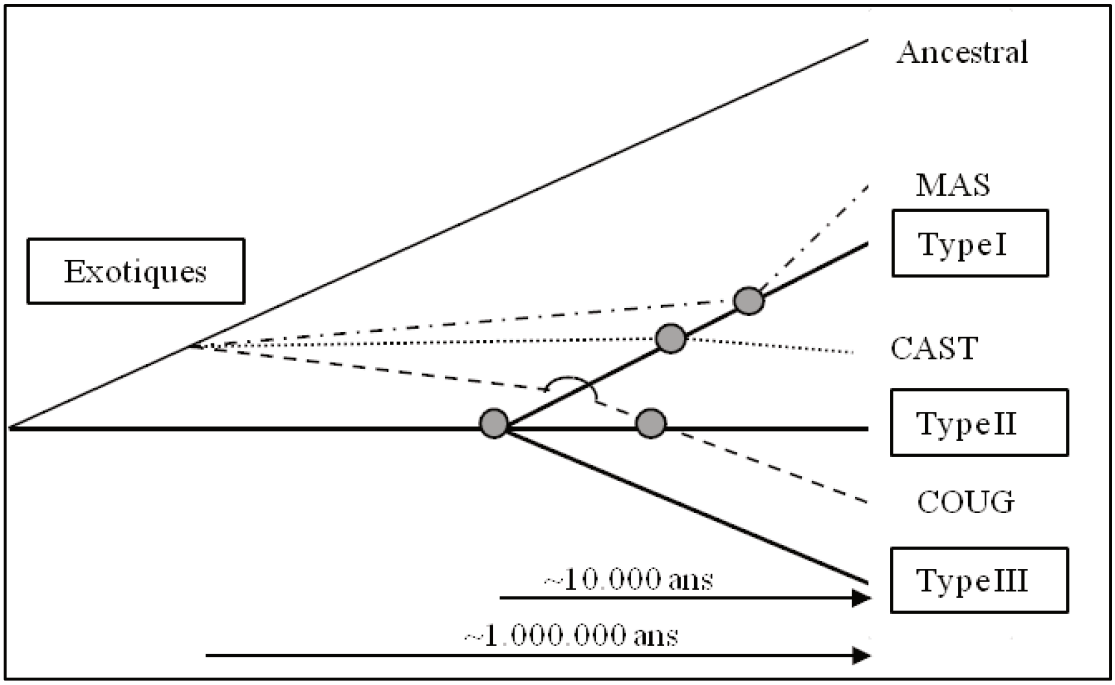


Figure 18 : Evolution des lignées clonales.
D'après (Su et al. 2003)

Si l'apparition des félidés et du toxoplasme remonte à environ 11 à 12 millions d'années (Johnson et al. 2006; Sibley 2003), certains travaux émettent l'hypothèse que les souches d'Amérique du Sud sont plus anciennes que celles d'Amérique du Nord et pourraient donc être le point d'origine de l'appariation des toxoplasmes (Lehmann et al. 2006). La transmission de ces souches d'Amérique du Sud ne se faisant que par l'intermédiaire de félidés sauvages et d'espèces hôtes dans un environnement naturel (cycle sylvestre), une étude suggère que les flux migratoires des félidés sauvages auraient permis la propagation de ces souches. Une fois isolées, elles auraient par la suite subit la diversité que l'on connait aujourd'hui (Sibley and Ajioka 2008). C'est donc il y a environ 10 000 ans que les souches de type II et III ont fait leur apparition (Boyle et al. 2006). Ces souches ont démontré un profil beaucoup moins virulent pour les souris que les souches d'Amérique du Sud (Shwab et al. 2014). Cette perte de virulence des souches de l'Ancien Monde peut être la résultant d'une co-évolution entre T. gondii et ses hôtes, qui est présente chez d'autres couples hôtes-pathogènes (Nieberding and Olivieri 2007; Barrett et al. 2008; Martinez-Hernandez et al. 2009; Kodaman et al. 2014; Bonneaud et al. 2018). Ainsi, chez la souris sauvage, T. gondii pourrait avoir exercé une pression sélective forte sur l'évolution des mécanismes de défense, en induisant un polymorphisme des protéines GTPases liées à l'immunité (IRG). Ces protéines sont essentielles à l'immunité de la souris contre une infection à T. gondii. Chez la souris domestique, ce polymorphisme les rend beaucoup plus sensibles aux souches virulentes

que les souris sauvages. La mortalité rapide de ces souris face à une souche virulente engendrera l'émergence de souches moins virulentes (Müller and Howard. 2016).

Mais c'est l'apparition de l'homme dans ces milieux sylvestres qui va conduire à la modification du cycle de vie du parasite. L'anthropisation de ces milieux va introduire des nouveaux hôtes (souris et chat domestiques) favorisant la sélection de certaines souches (Shwab et al. 2018). Ainsi, les souches isolées de région anthropisées de Guyane montrent une capacité de transmission par les chats domestiques supérieure aux souches isolées d'un milieu sylvestre, ce qui peut constituer une pression sélective dans les environnements liés à l'homme (Khan et al. 2014). L'expansion des zones anthropisées notamment par l'agriculture pourrait faciliter la propagation de ces génotypes de T. gondii adaptés aux environnements agricoles par rapport aux génotypes natifs. Les chats domestiques pouvant fortement contaminer des zones anthropisées (Gotteland et al. 2014), entraineraient une augmentation du taux d'infection chez les animaux d'élevages, ainsi qu'une expansion clonale d'un sous type de génotype de T. gondii (Ajzenberg et al. 2004).

I. 9. REPONSE IMMUNITAIRE

La réponse immunitaire de l'hôte face à une infection à T. gondii est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs. De façon générale, la primo-infection chez un patient immunocompétent entraine une réponse immunitaire protectrice de type Th1, liée à la persistance de kystes dans certains tissus (muscles, cerveau). Chez des patients immunodéprimés (VIH, greffe,…), l'absence de contrôle de la multiplication par le système immunitaire et la dissémination des tachyzoïtes à travers l'organisme peuvent entrainer des lésions graves pouvant être fatales.

I. 9. 1. La réponse immunitaire innée

Elle est dite non spécifique car elle fait appel aux cellules et aux mécanismes de défense de l'organisme de façon immédiate dès la pénétration du parasite dans l'organisme. Schématiquement, c'est majoritairement au niveau de l'intestin, lors de l'ingestion que les tachyzoïtes pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales (IEC) ce qui induit en premier lieu, la production de monoxyde d'azote (NO) et a pour effet de limiter la réplication du parasite mais aussi de recruter les lymphocytes intraépitheliaux qui ont pour rôle de détruire les entérocytes infectés (Buzoni-Gatel et al. 2008). Les IEC produisent également des cytokines (Interleukine-15 (IL-15), IL-1, IL-6, GM-CSF (Granulocyte-Macrophages Colony

Stimuling Factor)) et des chimiokines (MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), MIP-1α (macrophage Inflammatory Protein 1α) ou CCL3 (Chemokine (C-C motif ligand 3), MIP-β ou CCL4, et RANTES (Regulated on Activation and Normally T-cell Expressed and Secreted)) (Kasper et al. 2004) qui ont pour rôle d'initier le recrutement des cellules immunitaire comme les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendretiques (DC) vers le point d'inflammation (Miller et al. 2009). L'IL15, quant à elle, va permette le recrutement et l'activation des lymphocytes NKT (Natural Killer T cell) conduisant à la production d'interféron-γ (IFN-γ) au niveau de la lamina propria (espace sous la muqueuse digestive) (Buzoni-Gatel et al. 2008).

Les neutrophiles vont phagocyter les tachyzoïtes ce qui va induire la libération de facteurs semblables aux chimiokines, en particulier la cyclophiline-18 et la profiline l'un des Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) de T. gondii. La cyclophiline-18 va stimuler la production d'IL-12 via la reconnaissance par le récepteur à C-C chimiokine de type 5 (CCR-5) à la surface des macrophages et des DC (Aliberti et al. 2003). La profiline va activer la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères de récepteurs de l'immunité innée appelés Toll-Like Receptors (TLRs) présents à la surface des neutrophiles et des macrophages et plus précisément les TLR-11 et 12. La protéine adaptatrice MyD88 (Myeloid Differenciation Primary-Reponse Protein 88) va se fixer sur les dimères de TLRs formés, initiant une voie de signalisation activant la Transforming Growth Factor (TGF)-β Activated Kinase 1 (TAK1). La TAK1 initie alors les voies Nuclear Factor-Kappa B (NFκB) et Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). La phosphorylation de la sous unité IκB-α de NFκB permet la translocation des 2 sous unités (p50 et p65) au niveau du noyau et induisent l'expression de ses gènes cibles. La voie MAPK conduit à la phosphorylation de p38 qui à son tour conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que c-Jun initiant finalement à l'expression de cytokines inflammatoires (**Figure 19)** (Gazzinelli and Denkers 2006).

Bien que TLR11 et TLR12 soient exprimés chez les rongeurs, le gène TLR11 humain est un pseudogène non fonctionnel et le gène TLR12 humain est absent (Yarovinsky 2014). Cependant, d'autres PAMPs de T. gondii peuvent activés des TLRs différents. Les glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPIs) localisées à la surface du parasite et la Heat Shock Protein 70 (HSP70) sont des ligands de TLR2 (en association avec TLR1 ou TLR6) et TLR4 (Dupont et al. 2012) et TLR7 et TLR9 reconnaissent respectivement l'ARN et l'ADN de T. gondii au niveau d'endosomes (Sasai et al. 2018) permettant l'activation de la

voie de signalisation. L'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, IFN-γ ou le TNF-α, permet le contrôle de la prolifération du parasite qui est contre balancé par l'expression de cytokines comme l'IL-10 ou le TGF-β, qui régule la réponse immunitaire.

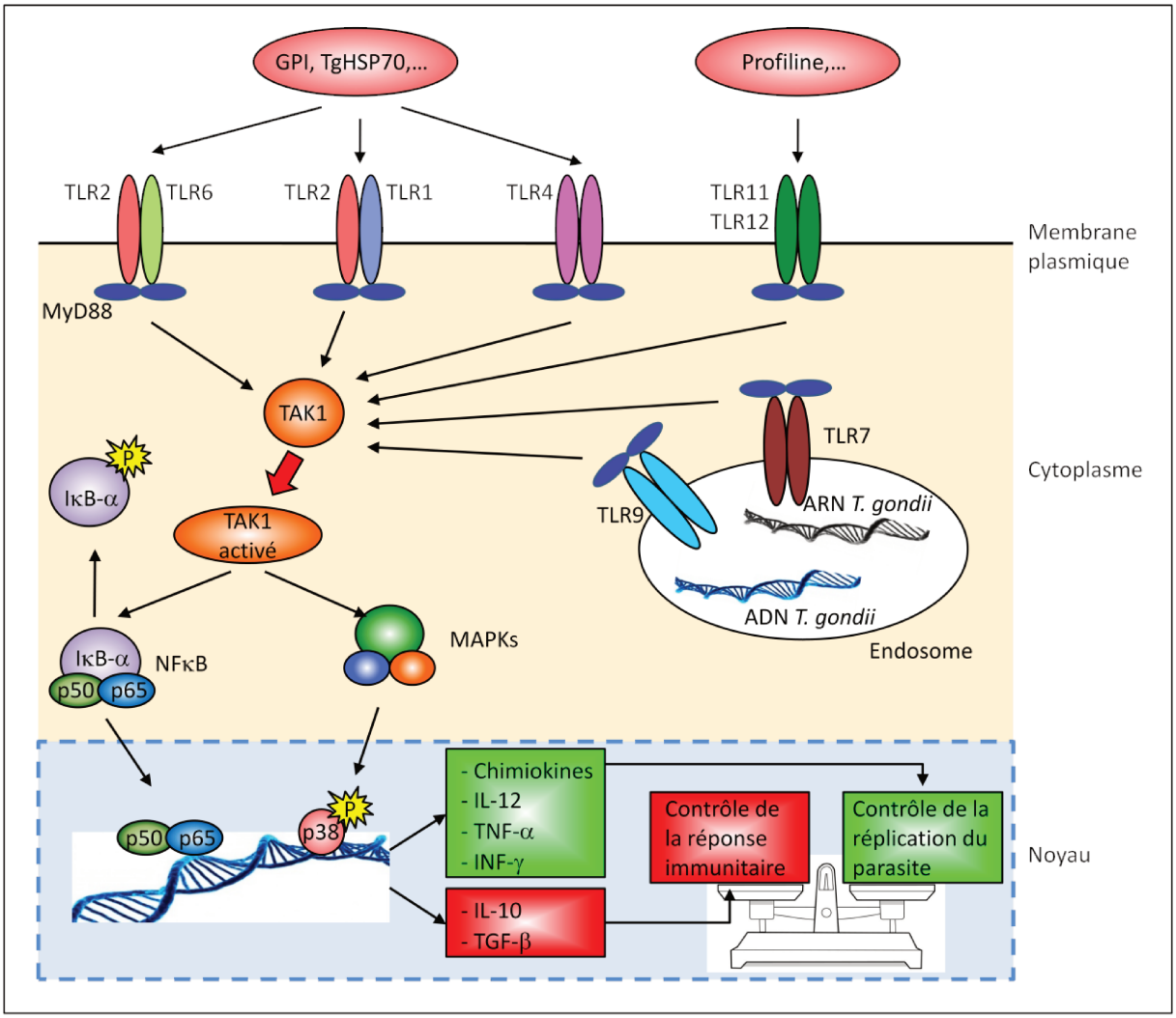


Figure 19 : Activation des Toll-Like receptors par T. gondii
D'après (Gazzinelli and Denkers 2006; Yarovinsky 2014)

La production d'IL-12, d'IFN-γ et de TNF-α oriente la réponse immunitaire spécifique vers l'activation des lymphocytes T helper 1 (Th1). Parallèlement au développement de la réponse protectrice Th1, se développe une voie Th2, caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-10, d'IL-5 et de TGFb au niveau des lymphocytes. La régulation négative de la réponse Th1 par les cytokines Th2 permet d'éviter les phénomènes immunopathologiques liés à une réponse inflammatoire excessive (Mennechet et al. 2004).

Cependant, les tachyzoïtes ont des moyens d'échapper au système immunitaire de l'hôte, leur permettant de parasiter des leucocytes et ainsi d'être disséminé dans tout l'organisme via le réseau sanguin. Ils vont alors pouvoir coloniser des organes (foie, la rate,

poumon, cerveau) ou des muscles où les tachyzoïtes vont se transformer en bradyzoïtes à l'intérieur de kystes.

I. 9. 2. La réponse immunitaire adaptative

La présence du parasite à l'intérieur de kystes va permettre au système immunitaire de mettre en place une protection spécifique et persistante. Cette réponse nécessite la présentation d'antigènes du toxoplasme par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ils sont reconnus par les récepteurs des cellules T (TCR) des lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Les lymphocytes CD4+ jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'infection chronique en produisant de l'IFN-γ et d'IL-2 (Guiton et al. 2009), ce qui va stimuler le développement des lymphocytes cytotoxique CD8+ qui vont avoir une action de lyse sur les cellules infectées par le toxoplasme (Jongert et al. 2010). La synergie entre les lymphocytes CD4+ et CD8+ permet un contrôle efficace de l'infection chronique à T. gondii.

I. 10. VIRULENCE DE T. GONDII

I. 10. 1. Chez la souris

En règle générale, la virulence d'un parasite est observée pour un hôte donné en fonction de la dose inoculée. La pathogénicité des souches de T. gondii est définie par l'étude de la virulence chez la souris. On détermine alors la Dose Létale 50 (DL50) et la Dose Létale 100 (DL100) qui sont les doses de parasites minimales pour entrainer la mort respectivement de 50% ou de 100 % des souris après inoculation de tachyzoïtes par voie intra-péritonéale. La virulence diffère suivant que la souche est de type I, II, III (Saeij et al. 2005) ou atypique (Behnke et al. 2011).

- Les souches de type I sont caractérisées par une virulence importante chez la souris. Elles ne forment pratiquement pas de kystes et sont très pathogènes puisque la dose létale 100% est proche de 1 toxoplasme. Leur taux de multiplication est 3 fois plus rapide que pour les autres souches (Boothroyd and Grigg 2002). Cependant, cette virulence n'est pas retrouvée chez le rat qui peut complètement éliminer les parasites grâce à leur système immunitaire (Cavailles et al. 2006; Li et al. 2012).
- Les souches de type II sont de virulence moyenne (ou intermédiaire). Elles sont responsables d'une infection toxoplasmique chronique chez la souris,

induisant la persistance de kystes tissulaires dans les muscles et le cerveau. Elles n'induisent la mort de la souris qu'au bout de plusieurs jours avec une dose significative de l'ordre de 10^3 à 10^5 toxoplasmes injectés.

- Les souches de type III sont de virulence faible ou avirulentes. Elles peuvent entrainer la mort de la souris en plus de 15 jours après une injection de $>10^5$ toxoplasmes.
- Les souches recombinantes ont des virulences très variables allant de non virulent à une virulence forte (Grigg and Suzuki 2003) alors que les souches atypiques présentent une virulence intermédiaire à forte (Dubey et al. 2011a; Grigg and Suzuki 2003; Wang et al. 2013a). Généralement, les génotypes avec une majorité d'allèles de type I sont les plus virulents (Mercier et al. 2011).

I. 10. 2. Chez l'homme

L'expression de la virulence chez les humains est un phénomène complexe en raion d'autres facteurs qui peuvent influencer le pouvoir pathogène des souches de T. gondii. L'expression de la pathogénicité est le résultat de l'interaction entre des facteurs parasitaires (stade infectieux, inoculum, patrimoine génétique de la souche) et des facteurs de l'hôte (statut immunitaire, facteurs génétiques) (Maubon et al. 2010).

I. 10. 3. Facteurs de virulence dans la cellule hôte

La survie du parasite résulte d'une bataille qui se déroule à l'intérieur de la cellule hôte. L'invasion de ces cellules par T. gondii est un processus actif, dirigé par le parasite et qui conduit à la formation de la vacuole parasitophore. Le processus d'invasion s'accompagne d'une fixation du parasite sur la cellule hôte via des protéines de surface (SAGs) et d'une sécrétion de protéines parasitaires issues des organites apicaux sécrétoires (ROPs, MICs et GRAs) (**Figure 20**). Ces protéines sécrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte peuvent manipuler les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. La plupart de ces protéines sont 'polymorphes', ce qui détermine les différences de virulence du parasite.

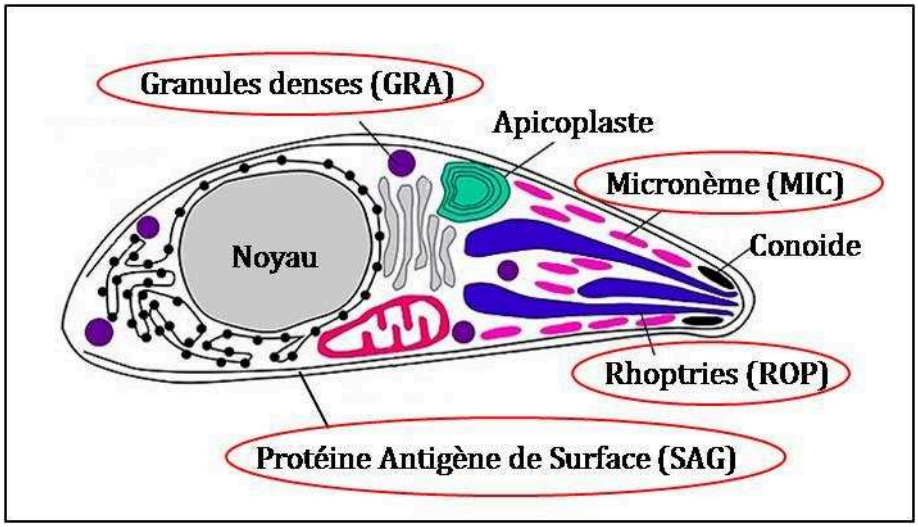


Figure 20 : Répartition des 4 groupes de protéines impliquées dans la virulence.
D'après (Ajika et al. 2001)

Nous avons choisi de nous intéresser à 8 protéines jouant potentiellement un rôle dans la virulence des souches de T. gondii d'après la littérature. Ce sont ces 8 protéines qui seront étudiées dans la 2^{e} partie de ce mémoire. Cette liste est loin d'être exhaustive. D'autres protéines peuvent également jouer un rôle dans la virulence des souches.

I. 10. 3. 1. Les protéines des granules denses

Les protéines des granules denses (GRAs) de T. gondii sont des protéines sécrétées, exprimées par les tachyzoïtes mais également par les bradyzoïtes, après la formation de la vacuole parasitophore (Nam 2009). C'est une famille qui comporte 25 protéines : GRA1 à GRA25 (Mercier and Cesbron-Delauw 2015). GRA11 et 13 ne sont pas considérés comme appartenant à cette famille (Rome et al. 2008).

GRA1 est une protéine de 24 kDa, sécrétée dans la vacuole parasitophore en tant que protéine soluble lors de l'invasion de la cellule hôte, favorisant la croissance du parasite. Elle possède également des propriétés à fixer le Ca2+, lui permettant de moduler la libération du calcium intracellulaire à l'intérieur des macrophages, suggérant une diminution de la réponse immunitaire de l'hôte (Lin et al. 2010).

GRA3 est une protéine transmembranaire de la vacuole parasitophore de 30 kDa. Elle se lie avec une protéine membranaire modulatrice de calcium (CAMLG : Calcium modulating ligand) située sur le réticulum endoplasmique de la cellule hôte (Bram and Crabtree 1994). Il en résulte une modification de la concentration de calcium intracellulaire, entrainant l'inhibition de l'apoptose de la cellule hôte et la survie à plus long terme des parasites à l'intérieur de cette cellule hôte (Feng et al. 2002).

I. 10. 3. 2. Les protéines des rhoptries

Les protéines des rhoptries sont nommées différemment en fonction de leur localisation à l'intérieur des rhoptries : soit au niveau du bulbe postérieur (ROP), soit au niveau du canal plus antérieur (RON). Ces protéines sont principalement excrétées lors de la pénétration du parasite à l'intérieur de la cellule hôte. La famille des ROPs de T. gondii comprend un ensemble de 34 gènes ayant un domaine d'activité kinase et 10 gènes 'pseudokinases' dépourvues de domaine d'activité kinase suite à des insertions ou à des délétions (Peixoto et al. 2010).

ROP18 est une sérine/théonine kinase qui est sécrétée dans la cellule et reste attachée à la membrane de la vacuole parasitophore. Son activité kinase inactive directement l'immunité de l'hôte par phosphorylation des Guanine TriPhosphatases (GTPases) liées à l'immunité (Fentress et al. 2010) protégeant ainsi la membrane de la vacuole parasitophore. ROP18 inhibe également la signalisation du facteur de transcription NF-κβ de l'hôte par association de sa sous unité p65 (Du et al. 2014). De plus, l'association de ROP18 avec le récepteur de stress ATF6β du réticulum endoplasmique de la cellule hôte interfère avec la présentation de l'antigène (Yamamoto et al. 2011), compromettant les réponses immunitaires médiées par les cellules T CD8. Elle est considérée comme jouant un rôle majeur dans la virulence des souches sud américaines dans le modèle murin (Behnke et al. 2015).

ROP16 est une tyrosine-kinase qui est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte. Son activité kinase permet la phosphorylation directe du transducteur de signal et activateur de la transcription (Signal Transducer and Activator of Transcription) STAT3 et STAT6, conduisant à l'augmentation de la production de certaines cytokines (comme l'interleukine-6 ou -4) inhibant la signalisation de l'interleukine-12 (IL-12) (Saeij et al. 2007; Yamamoto et al. 2009) qui est une cytokine au centre de la réponse immunitaire en stimulant le développement des lymphocytes Th1, en activant les cellules Natural Killer (NK) et en induisant la production d'interféron-γ (IFN-γ).

ROP38 est une pseudokinase qui intervient dans la modulation de la programmation transcriptionnelle des cellules hôtes et des profils d'expression génétique (Peixoto et al. 2010) et bien que cette protéine ait un rôle restreint dans la virulence des souches, elle est nécessaire pour établir une infection latente (Fox et al. 2016).

I. 10. 3. 3. Les protéines du micronème

Les protéines du micronème (MICs) sont sécrétées lors du contact entre le parasite et la cellule hôte et facilitent l'adhésion par la reconnaissance des récepteurs sur la membrane cellulaire de l'hôte (Carruthers and Boothroyd 2007; Jewett and Sibley 2003). Elles ont un rôle important dans le stade précoce de l'invasion des cellules. Actuellement, cette famille regroupe 19 MICs connues (Wang and Yin 2015).

MIC1 est une adhésine soluble qui joue un rôle majeur de fixation cellulaire lors de la phase précoce de l'infection (Saouros et al. 2005). Elle se fixe à une autre adhésine soluble (MIC4) pour former un complexe qui est pris en charge par la protéine transmembranaire MIC6. Ce complexe permet la fixation du parasite à la surface de la cellule hôte (Cerede et al. 2005).

I. 10. 3. 4. Les protéines antigénique de surface

Les protéines antigéniques de surface (SAGs) font partie de la 'super famille' des antigènes parasitaires de surface ancrés à la membrane via des groupes glycosylphosphatidylinositol (GPI). Leur fonction principale est de stabiliser l'attachement du parasite sur la cellule hôte (Dzierszinski et al. 2000). Les membres de cette famille se retrouvent exclusivement à la surface des tachyzoïtes ou des bradyzoïtes, bien que le rôle exact de chaque protéine ne soit pas encore connu (Pollard et al. 2008). De plus, le très grand nombre de SAGs pourrait permettre au parasite de pénétrer dans une grande variété de cellules hôtes (Lekutis et al. 2001).

SAG1 est un antigène de surface majeur de 30 kDa, qui participe à la reconnaissance cellulaire ainsi que dans la réponse immunitaire de l'hôte. C'est une cible principale car la majorité des anticorps sont réactifs contre SAG1 durant l'infection (Wang and Yin 2014).

SAG3 est une protéine de 43 kDa ayant une structure similaire à SAG1. Cependant, SAG3 intervient dans la reconnaissance et l'attachement du parasite sur les cellules hôte via la fixation des protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG) (Jacquet et al. 2001).

II. ETUDE DE LA VIRULENCE DES SOUCHES AMAZONIENNES DANS LE MODELE MURIN ET DES MECANISMES DE PATHOGENICITE MOLECULAIRE ET IMMUNOLOGIQUE

CONTEXTE

Depuis les années 2000, de nombreux cas de toxoplasmose ont été diagnostiqués en Guyane. Ces descriptions ont constitué une véritable avancée sur la connaissance que les scientifiques avaient de la biodiversité génétique de T. gondii et de ses interactions avec l'hôte (Carme and Demar-Pierre 2006; Demar et al. 2007a; Demar et al. 2008). En effet, des cas sévères d'infections disséminées avec pour certains patients un pronostic vital engagé du fait d'atteintes respiratoires graves ont été rapportés en zones tropicales (Amérique du Sud, Asie) et ont impliqué des souches dites atypiques de T. gondii. Jusque-là, il existait une grande homogénéité génétique des souches circulant en Europe et Amérique du Nord avec une prédominance des 3 lignées clonales (type I, II, et III). En Guyane française, la plupart des souches isolées de patients ou d'animaux domestiques et sauvages présente une grande diversité génétique et un profil génétique particulier. Les atypiques sont en rapport avec un cycle forestier sauvage et les souches dites caribéennes en rapport avec les zones anthropisées (Carme et al. 2009; Khan et al. 2014; Mercier et al. 2011). Les souches atypiques sont à l'origine d'une entité nouvelle appelée la toxoplasmose amazonienne rapportant des formes cliniques sévères, multiviscérales, chez des sujets immunocompétents menaçant le pronostic vital par l'atteinte pulmonaire et avec la notion de contact avec les éléments de la forêt (eau, viandes, végétaux...) (Blaizot et al. 2018; Demar et al. 2007a).

La plupart des articles en rapport avec la toxoplasmose amazonienne ont abordé l'aspect sévérité clinique, épidémiologie et génotypage parasitaire de cette entité. Peu d'études ont été menées sur les mécanismes de virulence. C'est dans ce contexte que nous proposons, dans une approche scientifique globale et intégrée d'analyser via les outils expérimentaux, moléculaires et immunologiques, d'analyser les différents mécanismes permettant d'expliquer la virulence des souches isolées en Guyane française.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le but de cette étude est de s'inscrire dans une démarche scientifique afin de décrire le type de virulence des souches « amazoniennes » et de comprendre les mécanismes de la virulence de ces souches particulières et méconnues de Toxoplasma gondii.

Les objectifs principaux de l'étude sont :

- Décrire la virulence des souches dites « amazoniennes » selon un modèle souris en comparaison des souches de virulence connue.
- Analyser et identifier des facteurs de virulence moléculaires et immunologiques qui pourraient expliquer cette virulence.
- Définir le profil immunologique des souches amazoniennes en rapport avec la réponse de l'hôte.

Les objectifs spécifiques sont :

- Définir les paramètres de virulence permettant des comparaisons de souches (DL_{50}, DL_{99}, score prédictif de virulence).
- Confirmer des marqueurs moléculaires de virulence connus type ROP18
- Identifier de nouveaux marqueurs de virulence.
- Etablir des hypothèses sur les mécanismes de virulence mis en place sur le plan moléculaire et immunologique.

SYNOPSIS

Basé essentiellement sur le critère de diversité clinique et selon le biotope impliqué, nous avons effectué une sélection de souches isolées de prélèvements de patients présentant une toxoplasmose amazonienne, de même que ceux d'animaux de la faune guyanaise. La culture de 10 souches isolées en Guyane et de 3 souches de référence (type I, II et III), s'est effectuée sur des fibroblastes humains. Les tachyzoïtes produits vont dans un premier temps, être injectés à des doses croissantes à des groupes de souris. La rapidité et le taux de mortalité des ces groupes de souris nous permet d'obtenir plusieurs paramètres comme la DL_{50} ou la DL_{99}. Ces paramètres sont nécessaires pour déterminer une formule mathématique qui aboutira à l'établissement d'un score prédictif de virulence, permettant de classer les souches les unes par rapport aux autres en fonction de leur virulence.

L'analyse génotypique des tachyzoïtes de ces différentes souches permet également une comparaison génétique de certains marqueurs comme les microsatellites ou des gènes liés à la virulence. Une analyse phylogénétique nous indique l'évolution de ces souches ainsi que leur degré d'appartenance à un groupe particulier.

Une étude temporelle sur l'expression de gènes de virulence par analyse des ARNm démontre la surexpression de certains de ces gènes lors de l'infection des cellules hôtes. Parallèlement, l'utilisation d'une puce à ADN nous renseigne sur la quantité d'ARNm produite par les tachyzoïtes à un moment donné de l'infection des fibroblastes et permet d'identifier d'éventuels marqueurs ou gènes impliqués dans le mécanisme physiopathologie de T. gondii.

Enfin, une injection d'une quantité connue de tachyzoïtes chez le modèle murin permet de définir un profil immunologique lié à une infection avec ces souches 'atypiques'. Un dosage simultané sur 24 cytokines-chemokines de souris est réalisé avec la technologie Luminex.

Ces différentes études et analyses devraient permettre de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques mis en jeu par les souches « amazonienne » et donc de mieux définir les mécanismes de pathogénicité.

II. 1. DETERMINATION DE LA VIRULENCE CHEZ LA SOURIS

II. 1. 1. Méthodologie

II. 1. 1. 1. Souches étudiées

Dix souches de T. gondii isolées en Guyane, soit de patients, soit d'animaux, ont été utilisées pour cette étude (**Figure 21**). La contrainte des manipulations expérimentales de même que le critère éthique de plus en plus mis en avant dans l'expérimentation animale, nous ont conduits à étudier un nombre restreints de souches.

- Pour effectuer la sélection des souches humaines au sein des souches disponibles au CRB Toxoplasma, nous avons choisi les souches impliquées dans la Toxoplasmose Amazonienne en tenant compte essentiellement du critère de sévérité clinique en rapport avec le type d'atteinte clinique (disséminée multi-viscérale ou non), le type de prise en charge (ambulatoire versus hospitalisation en service clinique classique versus hospitalisation en réanimation médicale) et l'évolution du patient (décès, évolutions avec complications). Nous avons donc sélectionné cinq souches isolées de patients hospitalisés dans un des centres hospitaliers de Guyane (Cayenne et/ou Saint-Laurent-du-Maroni) (**Tableau 2**) qui présentaient des signes cliniques compatibles avec une toxoplasmose aigüe avec un gradient de sévérité clinique ayant modulé la prise en charge clinique. Tous les diagnostics ont été confirmés par l'évolution sérologique (séroconversion et/ou ascension significative des IgM et IgG lors de la prise en charge) et par diagnostic moléculaire (qPCR positive), l'inoculation positive à la souris ayant permis l'isolement des souches.

  Les patients présentaient les critères de toxoplasmose amazonienne en accord avec la description rapportée (Carme et al. 2002, Demar et al. 2012, Blaizot et al. 2018) :

  - Pas de critères d'immunodépression connue ou évidente
  - Syndrome infectieux marqué, non spécifique
  - Atteinte viscérale et/ou multi viscérale
  - Contact avec des éléments de la forêt (consommation de viande de gibiers ou eaux des criques….

  Ainsi qu'une description de ces souches comme amazonienne car atypiques par l'étude génotypique par microsatellites (Ajzenberg et al. 2010).

A ce jour, aucune souche de type 'caribéenne' humaine n'a été isolée d'un processus pathologique compatible avec la toxoplasmose dite amazonienne (données CNR Toxoplasmose/CRB).

La souche GUY-WAY-2007 a été isolée d'un patient ayant présenté une broncho-pneumopathie sans aucun critère de gravité ou de sévérité. La souche GUY-GRO-2011 a été impliquée dans une présentation clinique d'hépatite aigüe isolée sévère tout à fait inhabituelle pour les toxoplasmoses. La souche GUY-MEL-2003 a été présentée comme une souche impliquée dans une forme sévère car bien que la présentation clinique initiale était banale (pneumopathie sans critères de gravité), elle a donné une évolution clinique singulière et défavorable (complications cardiaques). A l'inverse, nous avons voulu travailler sur des souches impliquées dans une forme très sévère de toxoplasmose avec un séjour dans le service de réanimation avec une évolution favorable dans un cas (GUY-AKO-2004) et avec une issue fatale dans un deuxième cas (GUY-TOJ-2006).

Il est vrai que critère géographique pour les souches humaines n'a été que très peu considéré vu que celles ayant permis de décrire la toxoplasmose amazonienne évoluent essentiellement dans le biotope forestier, principalement à l'intérieur du territoire, au regard des interrogatoires des patients contaminés.

- Pour effectuer la sélection de 5 souches animales au sein des souches disponibles au CRB Toxoplasma, nous avons utilisé les critères génotypiques des souches, le biotope (forestier vs. anthropisé) et le type d'hôtes (sauvages vs. domestiques) (**Tableau 3**). Nous nous sommes intéressés à deux souches provenant de la faune sauvage, une souche isolée de l'hôte définitif, le Jaguar (GUY-JAG-2004) et une souche isolée d'une espèce sauvage, le grison circulant dans le biotope anthropisé (GUY-GAL-VITT001). Nous avons également sélectionné trois autres souches de la faune domestique isolés de chiens euthanasiés à la fourrière de Cayenne (GUY-CAN-FAM0001, GUY-CAN-FAM0002 GUY-CAN-FAM0007). Dans ce groupe « souches animales », on retrouve l'atypie moléculaire des souches GUY-JAG-2004 et GUY-CAN-FAM0007 telle que décrit dans le groupe «souche humaine» et l'aspect plus recombinant des génotypes dits «caribéen» chez les 3 souches GUY-CAN-FAM0001, GUY-CAN-FAM0002 et GUY-GAL-VIT0001. Ces données disponibles sont issues de travaux de recherche portant sur le

réservoir animal de T. gondii en Guyane française (Demar et al. 2008, Mercier et al. 2011).

Outre les critères ci-dessus cités, les souches issues des croisements souches amazoniennes dans espèce domestique (GUY-FAM-007) et souches recombinantes type caribéenne dans l'espèce sauvage (GUY-GAL-VIT001) présentaient un intérêt d'étude quant à leur comportement in vivo.

- Nous avons également utilisé trois souches de référence de type différent (I, II et III) (
-
- Tableau 4). Un nombre non négligeable de publications en rapport avec la virulence de ces souches in vitro et in vivo est disponible dans la littérature permettant une comparaison avec des souches jusque là non étudiées.

Toutes ces souches ont été fournies par le Centre de Ressources Biologiques (CRB)/Centre National de Référence (CNR) Toxoplasma (Limoges, France).

Tableau 2 : Souches de T. gondii isolées de patients

Souche*	Code CRB *Toxoplasma*	Symptômes	Gradient de sévérité clinique	Lieu présumé de contamination	Génotype Microsatellite	Références
GUY-WAY-2007	TgH18028	Fièvre, bronchite persistante	+/- Hospitalisation classique Evolution favorable sous TRT	Boussassa (Rivière Maroni, site Papaïchton)	Amazonien	(Mercier et al. 2011)
GUY-GRO-2011	TgH18049	Fièvre, hépatite aiguë sévère	+ Hospitalisation classique Evolution favorable sous TRT	Maripasoula (Rivière Maroni)	Amazonien	N.C.
GUY-MEL-2013	TgH18007	Fièvre, pneumopathie, cardiopathie,	+ Hospitalisation classique Complications cardiaques Décès de complications cardiaques 2 ans après le diagnostic.	Tamanoir cove (Rivière Mana)	Amazonien	(Ajzenberg et al. 2004)
GUY-AKO-2004	TgH18009	Fièvre, anasarque, atteinte cardiaque (myocardite aiguë, péricardique…)	++ Hospitalisation en réanimation Evolution favorable sous TRT	Sparouine (Rivière Maroni, site Apatou)	Amazonien	(Mercier et al. 2011)
GUY-TOJ-2006	TgH18021	Fièvre, défaillance multiviscéral (cardiaque, rénal, neurologique)	+++ Hospitalisation en réanimation. Décès sous TRT	Nason (Rivière Maroni)	Amazonien	(Mercier et al. 2011)

N.C. : Non Communiqué

Tableau 3 : Souches de T. gondii isolées de la faune.

Souche*	**Code CRB Toxoplasma**	**Animal**	**Génotype Microsatellite** d'après (Mercier et al. 2011)	**Références**
GUY-CAN-FAM0001	TgA18002	Chien (Canis familiaris)	Caribéen type 1	(Mercier et al. 2011)
GUY-CAN-FAM0002	TgA18004	Chien (Canis familiaris)	Caribéen type 2	(Mercier et al. 2011)
GUY-CAN-FAM0007	TgA18006	Chien (Canis familiaris)	Amazonienne	(Mercier et al. 2011)
GUY –JAG-2004	TgA18001	Jaguar (Panthera onca)	Amazonienne	(Demar et al. 2008)
GUY-GAL-VIT0001	TgA18005	Grison (Galictis vittata)	Caribéen intermédiaire	(Mercier et al. 2011)

Tableau 4: Souches de référence de T. gondii

Souche	**Code CRB Toxoplasma**	**Génotype**	**Références**
RH	-	Type I	(Sibley et al. 2002)
PRU	TgH18001	Type II	(Ajzenberg et al. 2004)
VEG	TgH18005	Type III	(Sibley et al. 2002)

* Afin de faciliter la lecture et d'alléger les figures, les noms de souches humaines et animales ont été volontairement abrégées dans la suite du document.

Figure 21 : Lieux présumés de contaminations humaines et sites de capture

La récupération de souches de T. gondii est difficile car ce parasite est tissulaire, ce qui nécessite l'inoculation du parasite encore vivant aux souris à partir de tissus frais, et donc la présence d'une logistique et d'une animalerie proche du lieu de prélèvement. Ces limitations expliquent la rareté des souches provenant d'animaux sauvages ou d'endroits d'accès difficiles.

II. 1. 1. 2. Culture des tachyzoïtes

Les tachyzoïtes de T. gondii sont cultivés sur une monocouche de fibroblastes humains HFF-1 (Human Foreskin Fibroblasts, ATCC®: SCRC-1041TM) (**Annexe 1**). Ces cellules sont cultivées dans des flasques de 25 cm² contenant 4 ml de milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) et L-glutamine (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) et un mélange pénicilline (100 U/ml) – streptomycine

(100 µg/ml) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). Elles sont incubées à 37°C en atmosphère humide sous 5 % de CO_2. Avant l'infection, le milieu de culture est remplacé. Les cellules HFF-1 confluentes sont ensuite infectées avec 10^5 tachyzoïtes (Tobin et al. 2010). Le repiquage sur une nouvelle flasque s'effectue au bout de 5 à 8 jours suivant le taux de multiplication des souches. Les tachyzoïtes sont alors libres dans le milieu après la lyse presque totale des cellules.

II. 1. 1. 3. Règles éthiques

Toutes les expérimentations réalisées sur les souris dans cette étude ont suivi les recommandations de la directive Européenne n°86/609/CEE ainsi que le décret n°2013-118. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par la Direction Services Vétérinaires (DSV) et par le comité d'éthique de l'Institut Pasteur sous la référence C2EA 89 - CETEA Institut Pasteur. Tous les efforts ont été faits pour minimiser le nombre de souris et leur souffrance en accord avec la réglementation.

II. 1. 1. 4. Souris

Les souris utilisées lors de l'expérimentation animale sont des souris Swiss CD-1® (**Annexe 2**) provenant du laboratoire Charles Rivers (Lyon, France). Elles ont été acclimatées à l'animalerie de l'Institut Pasteur de la Guyane. Après injection de tachyzoïtes, les souris sont confinées dans une armoire ventilée à l'animalerie P2 de l'Institut Pasteur de la Guyane.

II. 1. 1. 5. Inoculation à la souris

La virulence des souches de T. gondii est déterminée par la mortalité cumulée des souris après injection péritonéale. Les tachyzoïtes sont comptés sur cellules de Kova afin de pouvoir injecter 1 ml par voie intra-péritonéale avec différentes doses allant de 5 à 5.10^4 tachyzoïtes/ml à des groupes de 10 souris. Un groupe contrôle de 10 souris a été injecté avec 1 ml d'eau physiologique. Les souris ont été observées pendant 31 jours. Quand une souris meurt, la pointe du cœur (apex) est recueillie et congelée. Après la fin de la période d'observation, les souris survivantes ont été euthanasiées et la pointe du cœur (apex) est recueillie et congelée.

II. 1. 1. 6. Quantification des tachyzoïtes injectés

Le nombre de tachyzoïtes injectées est également vérifié par PCR quantitative en temps réel. Elle permet de contrôler que l'on a injecté le bon nombre de tachyzoïtes dans chacun des groupes de souris.

II. 1. 1. 6. 1. Extraction d'ADN

L'ADN est extrait à partir de 200µl de la solution injectée aux souris, à l'aide du DNeasy® Blood and Tissue Kit de Qiagen® (Hilden, Germany) suivant les recommandations du fabriquant. L'ADN est élué dans 200µl de tampon AE (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

II. 1. 1. 6. 2. Quantification par PCR en temps réel

Les amorces et la sonde spécifique de T. gondii ont été choisies dans la région répétée de 529 pb. (Accession GenBank no. AF146527) (Homan et al. 2000). Les amorces et la sonde Taqman® ont été conçues en utilisant le logiciel Primer Express® 3.0 (Applied Biosystems™). Les séquences du système utilisé sont résumées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Séquences du système de détection de T. gondii par qPCR

ToxoRepeat224F	5' GCTCCTCCAGCCGTCTTG 3'
ToxoRepeat283R	5' TCCTCACCCTCGCCTTCAT3 '
ToxoRepeat243P	5'6-FAM-AGGAGAGATATCAGGACTGTA-NFQ-MGB3'

Les réactions de qPCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl contenant 1×TaqMan® Gene Expression Master Mix avec Uracyl-DNA-glycosylase (Applied Biosystems™), 0,9 µM de chaque amorce, 0,25 µM de la sonde, 5 µl de matrice d'ADN ainsi que 3 µl de TaqMan® Exogenous Internal Positive Control (Exo IPC) (Applied Biosystems™). Ce système Exo IPC est composé d'une matrice d'ADN chimérique ainsi que de 2 amorces et d'une sonde spécifique à cet ADN. Ce système permet de vérifier l'absence d'inhibiteur dans la réaction.

Une gamme étalon contenant une concentration initiale en ADN connue correspondant à 10^5 tachyzoïtes avec des dilutions de facteur 10 est amplifiée en même temps que les échantillons. Cela permet d'avoir une corrélation entre le résultat obtenu et la quantité d'ADN de T. gondii présent dans les échantillons à tester.

Le cycle d'amplification se décompose en 3 étapes :

- L'activation du système Uracyl-DNA-glycosylase permettant la dégradation d'amplicons contaminants, 2 min. à 50°C .
- La dénaturation des doubles brins d'ADN de la matrice, 10 min. à 95°C.

- L'amplification composée d'une étape de dénaturation des doubles brins d'ADN 15 s. à 95°C. et d'une étape couplée d'hybridation sonde/amorces et d'élongation 1 min. à 60°C.

II. 1. 1. 7. Quantification des tachyzoïtes dans les cœurs de souris

Cette quantification est réalisée sur l'ensemble des cœurs des souris afin de vérifier que les souris ont bien été en contact avec T. gondii.

II. 1. 1. 7. 1. Extraction d'ADN

Les cœurs de souris prélevés après leur mort sont extraits à l'aide du DNeasy® Blood and Tissue Kit de Qiagen® (Hilden, Germany) suivant les recommandations du fabriquant. L'élution est réalisée avec 200 µl de tampon AE. L'ADN extrait est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

II. 1. 1. 7. 2. Quantification par PCR en temps réel

La PCR en temps réel est réalisée avec le système amorce-sonde spécifique de T. gondii décrit dans le **Tableau 5**.

Les sondes TaqMan® qui sont utilisées, reposent sur le principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). La sonde qui est un fragment d'ADN complémentaire à la matrice et comprise entre les 2 amorces, a été marquée avec un fluorochrome sur son extrémité 5' et avec un 'extincteur' (Quencher) sur son extrémité 3' qui est capable d'absorber l'énergie émise par le fluorochrome pour réémettre, ou pas (dans le cas de quencher non fluorescent) une fluorescence à une nouvelle longueur d'onde.

Les sondes utilisées sont marquées avec le fluorochrome6-carboxyfluorescéine (FAM) en 5' et avec un quencher non fluorescent en 3' qui est de 2 types suivant la chimie du fournisseur :

- Non Fluorescent Quencher (NFQ) couplé avec une protéine Minor Groove Binder (MGB) (Applied Biosystems™) permettant le maintient de la sonde sur le brin matrice. Cette protéine permet de diminuer le nombre de paires de bases de la sonde.
- Black Hole Quencher (BHQ-1™) (Eurogentec)

Les réactions de qPCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl contenant 1×TaqMan® Gene Expression Master Mix avec Uracyl-DNA-glycosylase (Applied

Biosystems™), 0,9 µM de chaque amorce, 0,25 µM de la sonde, 5 µl de matrice d'ADN ainsi que 1,25µl de Mouse ACTB (Actin, Beta) Endogenous Control (Applied Biosystems™) et 1,75 µl de H_2O (en remplacement du système Exo IPC). Ce système Mouse ACTB permet de normaliser les échantillons grâce à un témoin avec 25 mg de cœur de souris. L'amplification est réalisée suivant les mêmes étapes que précédemment (**cf. II. 1. 1. 6. 2**).

II. 1. 1. 8. Détermination de la DL_{50} et de la DL_{99}

A la fin de la période d'observation de chaque souche (31 jours), les données sont compilées et analysées.

Les courbes de survie de mortalité ont été analysées avec la méthode de Kaplan-Meier ((Rich et al. 2010) à l'aide du test Log-rank afin de comparer la survie des souris et les données de mortalité des groupes expérimentaux dans le logiciel XLSTAT-Biomed (Addinsoft 2017). La valeur de p de 0,05 était considérée comme significative.

L'analyse dose-effet est basée sur une régression logistique (modèle Probit) afin de modéliser l'impact des doses de tachyzoïtes sur la survie d'un groupe de souris. L'analyse a permis de déterminer la Dose Létale 50 (DL_{50}) et la dose létale 99 (DL_{99}). La DL_{50} et DL_{99} correspondent respectivement à la dose nécessaire de parasite pour tuer 50% ou 99% d'une population. Ces DL permettent d'avoir un aperçu de la virulence des souches. Plus la dose nécessaire pour tuer 50% ou 99% est faible, plus la souche sera considérée comme virulente.

II. 1. 1. 9. Calcul du Score de Virulence (SV)

Les Doses Létales ne prennent pas en compte le nombre de souris injectées, ni le temps nécessaire à la mort des souris, ni le nombre de souris mortes. Nous avons donc essayé d'établir un score prédictif de virulence (SV) en prenant en compte tous ces paramètres, ce qui permet un classement de nos souches de Guyane par rapport aux souches de référence. Le calcul est le suivant :

$$\text{Score de Virulence (SC)} = \text{moy}\left(\frac{1}{\log(tachy\ inj)} \times \left(\frac{1}{moy\ survie}\right) \times \left(\frac{(souris\ mortes \times 100)}{souris\ inj}\right)\right)$$

Avec : tachy inj : nombre de tachyzoïtes injectés
moy survie : moyenne des jours de survie des souris après injection
souris mortes : nombre de souris mortes pour la dose donnée
souris inj : nombre de souris injectées

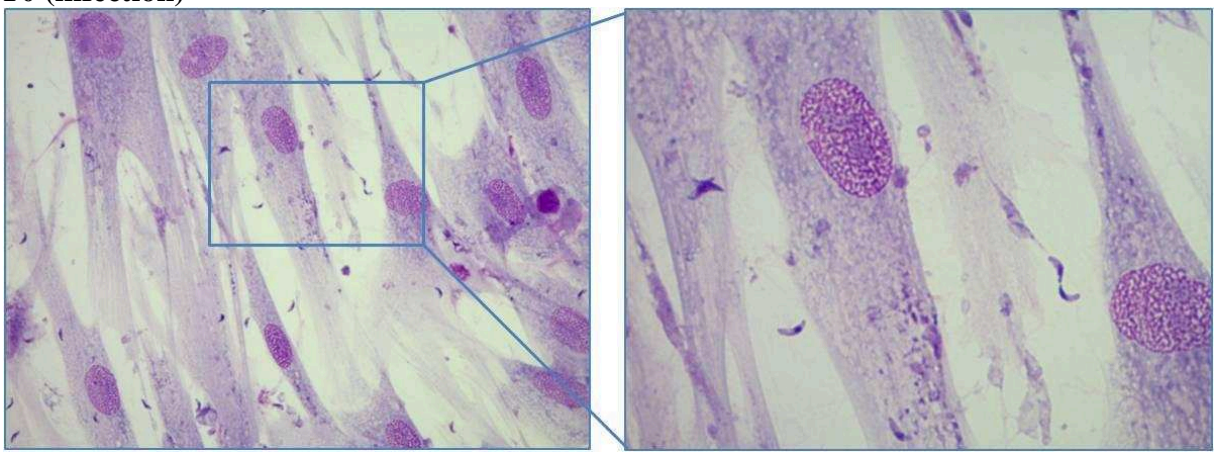
Il est entendu que ce modèle ne peut comparer que des souches qui ont été inoculées dans la même espèce de souris. L'utilisation d'autres espèces de souris donnera des résultats différents en fonction de la sensibilité de l'espèce au toxoplasme. Il faudra donc utiliser une ou des souches de référence afin d'avoir un comparateur.

II. 1. 2. Résultats et discussion thématique

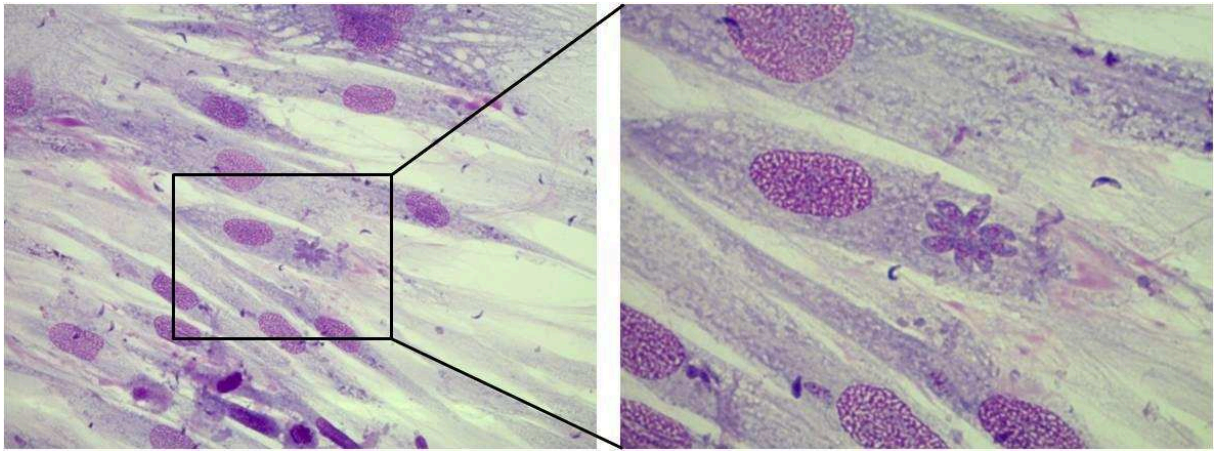
II. 1. 2. 1. Culture des tachyzoïtes

La multiplication des tachyzoïtes à l'intérieur des fibroblastes HFF-1 est rapide et varie en fonction de la souche. Mais cette multiplication aboutie à la destruction de la quasi-totalité des fibroblastes en 120 à 168 h. post infection (**Figure 22**).

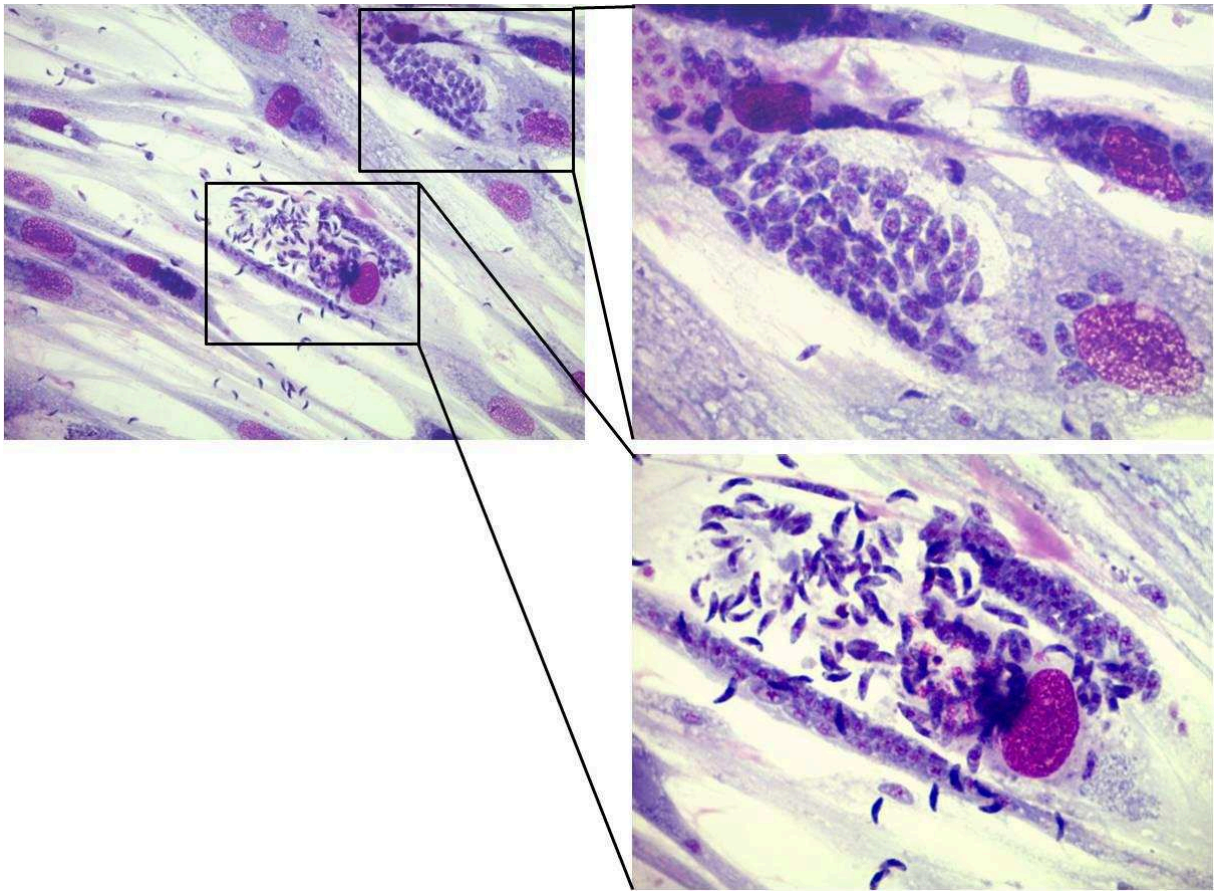
T0 (infection)



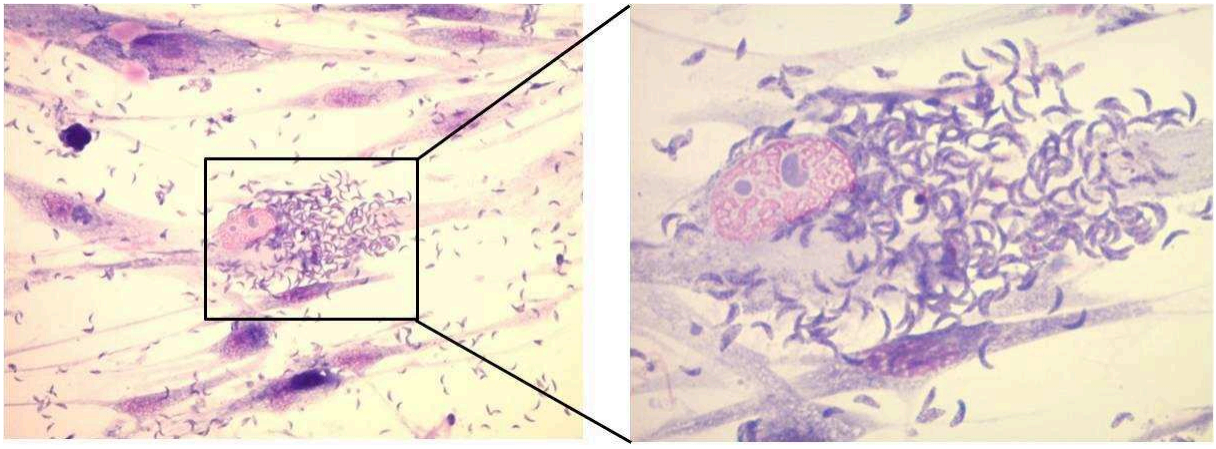
T24



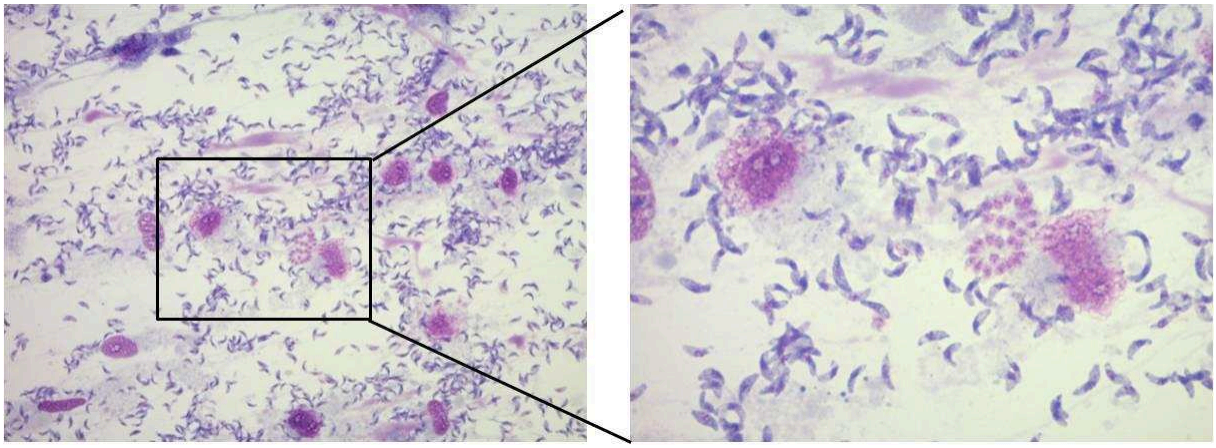
T48



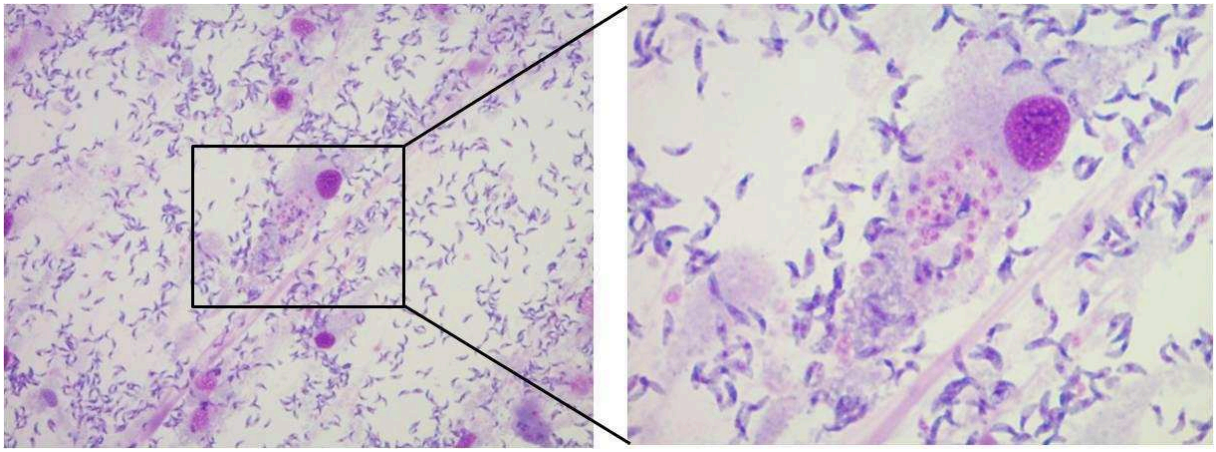
T72



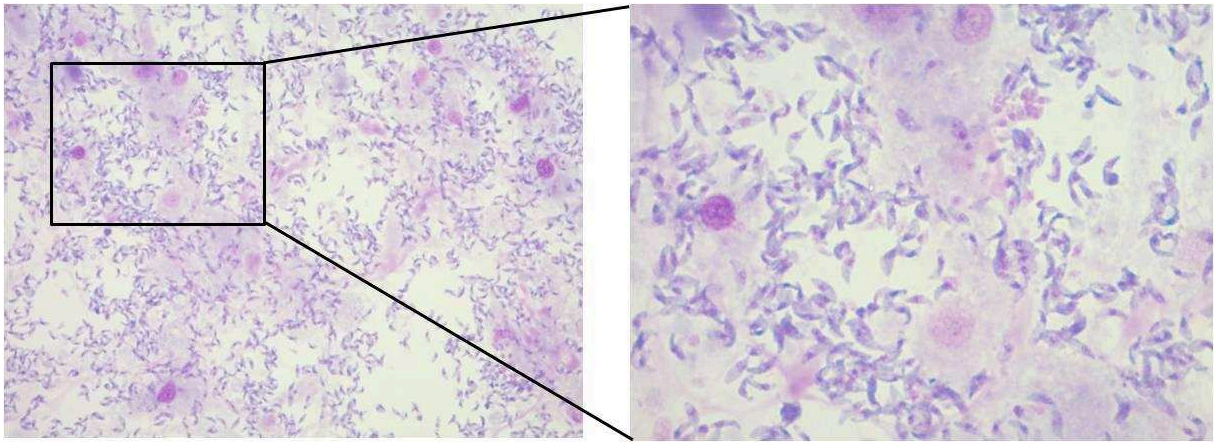
T96



T120



T144



T168

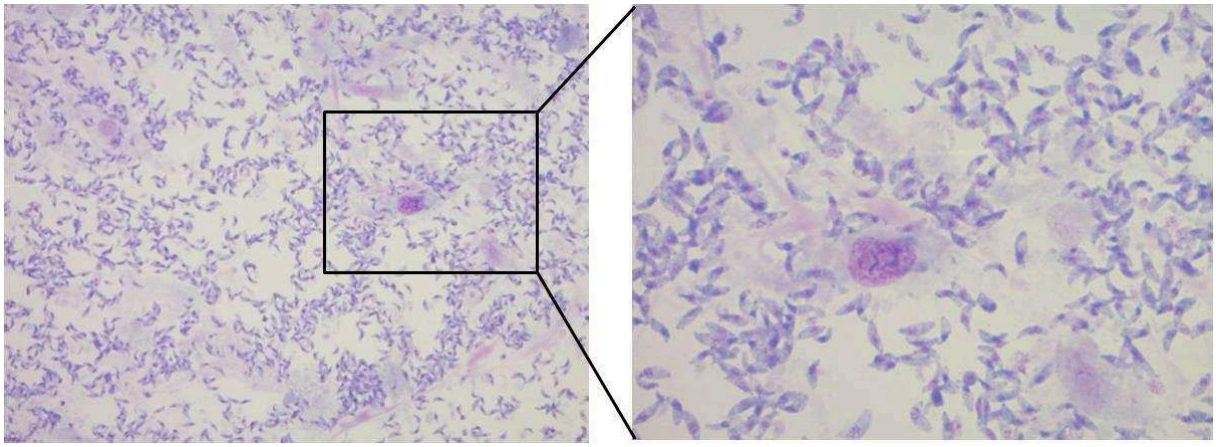


Figure 22 : Evolution d'une culture de la souche RH sur cellules HHF-1
La multiplication intracellulaire des tachyzoïtes conduit à la destruction de la couche monocellulaire de HFF-1 en 168h.

II. 1. 2. 2. Quantification des tachyzoïtes injectés

Afin d'avoir un compte précis du nombre de tachyzoïtes injectés aux souris, un comptage est effectué dans une cellule de Kova. Les doses injectées vont de 5 à 5.10^5 tachyzoïtes par souris. Nous avons décidé de ne pas faire des groupes avec des dilutions sériées pour avoir 1 tachyzoïte car le risque de ne rien injecter est très élevé. La quantification en PCR temps réel (**Figure 23**) corrobore le comptage que nous avons effectué sur cellule de Kova.

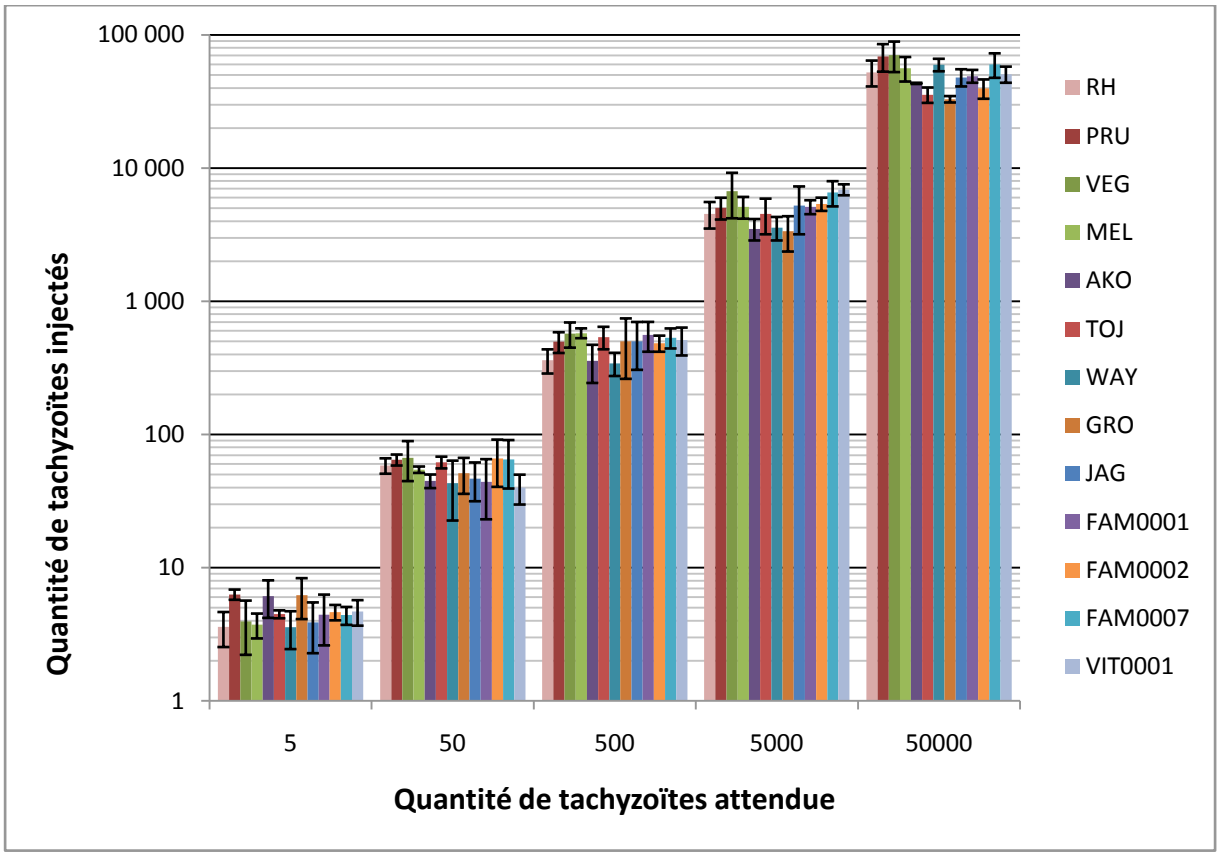


Figure 23 : Quantification du nombre de tachyzoïtes injectés selon les groupes par qPCR

II. 1. 2. 3. Détermination de la virulence des souches

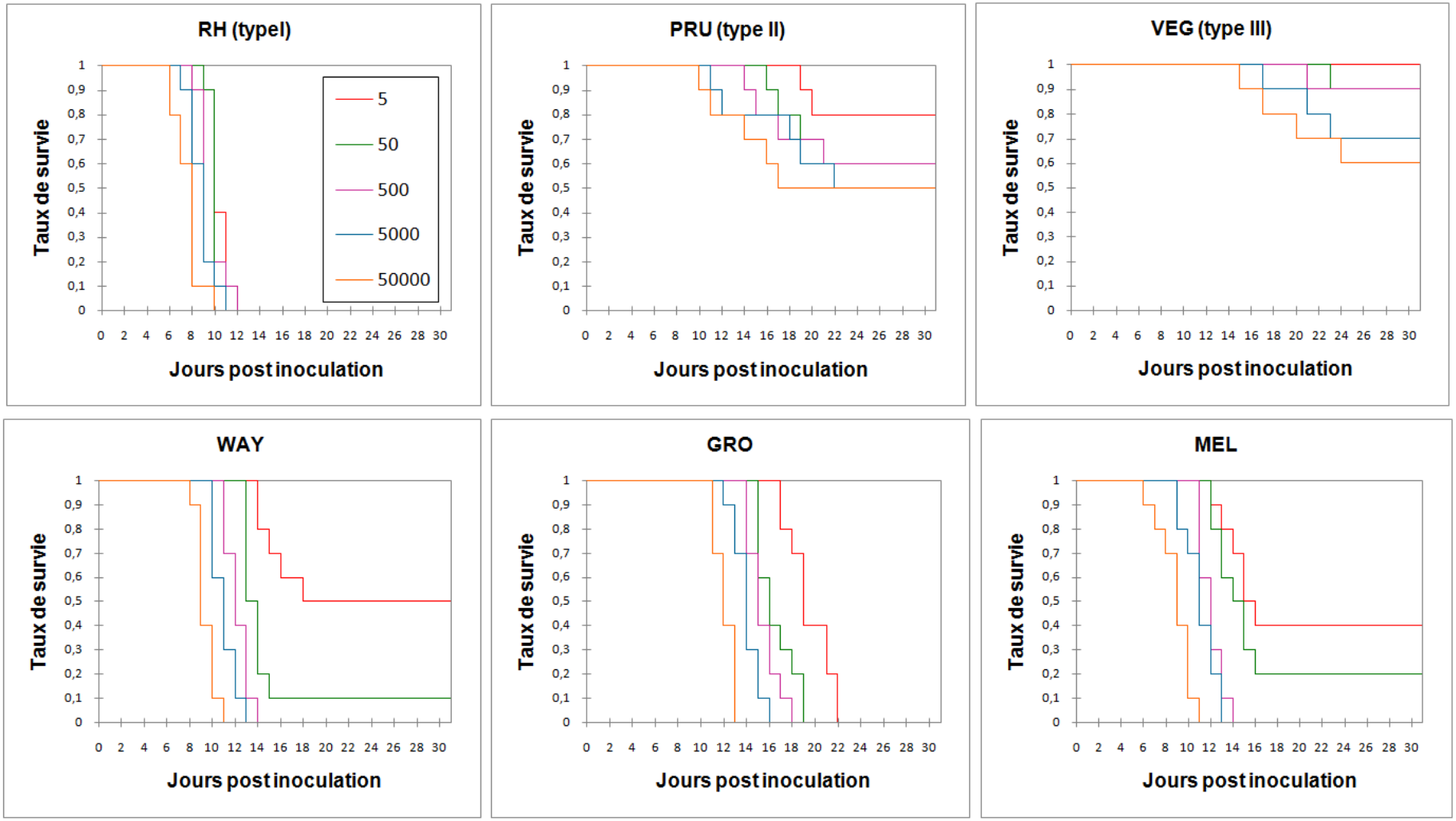
Les courbes suivantes (**Figure 24**) représentent la mortalité des souris après injection des différentes doses pour chacune des souches de toxoplasmes. Les 3 premiers graphiques représentent la virulence des souches de référence : RH (type I), PRU (type II), VEG (type III), suivi par les graphiques des souches de Guyane.

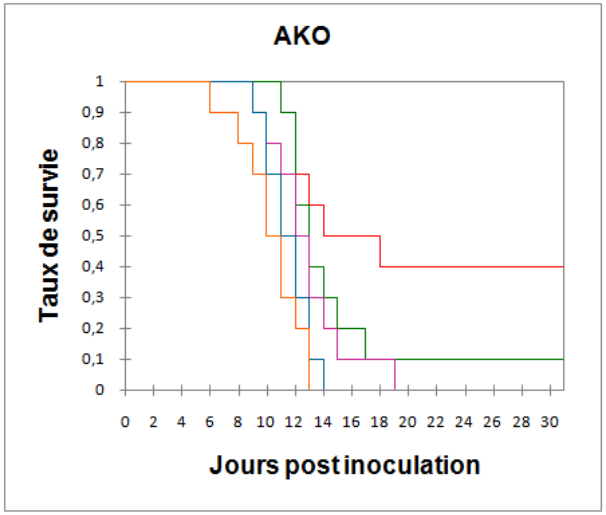
Lors du déclenchement de la maladie chez les souris, certains symptômes apparaissent (perte de poids, asthénie, poil hérissé). La mort intervient généralement entre 2 à 5 jours après le début de ces symptômes. Ces symptômes sont plus diffus mais permanents chez les souris ayant survécu pendant toute la durée de l'expérimentation.

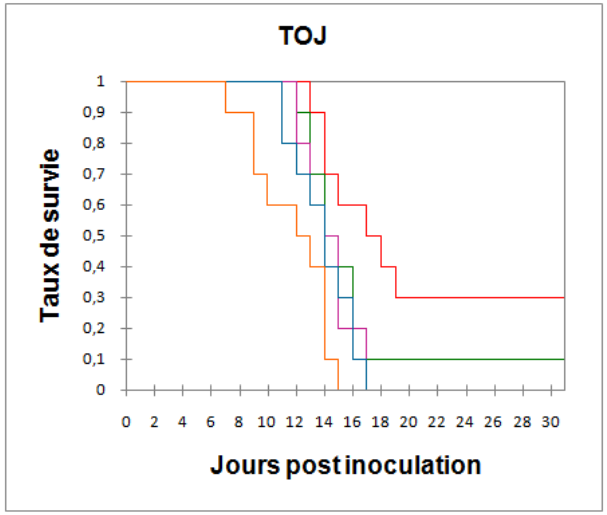
La mortalité survient très rapidement avec la souche RH (type I) et le taux de mortalité des souris est de 100% quelque soit la dose injectée. Avec la souche PRU (type II), la mortalité intervient après un temps d'incubation plus long avec un taux de mortalité faible. La souche VEG (type III) est très peu virulente car la mortalité intervient tardivement (après 14 jours d'incubation). De plus, l'injection d'une dose faible (5 tachyzoïtes) ne provoque

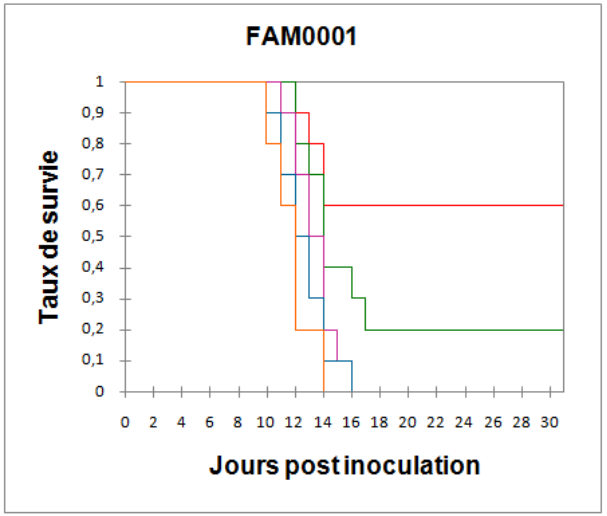
aucune mortalité, et l'injection de doses plus importantes de tachyzoïtes (5.10^3 et 5.10^4) ne parvient pas à tuer plus de la moitié de la population.

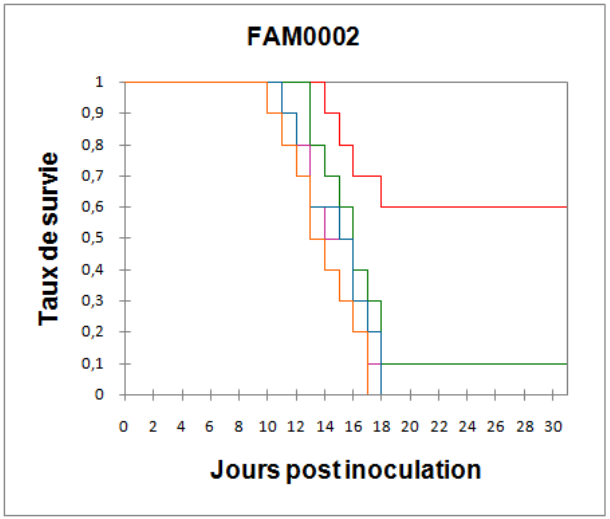
Avec les souches de Guyane (patients ou animaux), les profils qui se dessinent sont proches de la souche RH. C'est-à-dire, une mortalité qui intervient rapidement après l'injection et un taux de mortalité important.

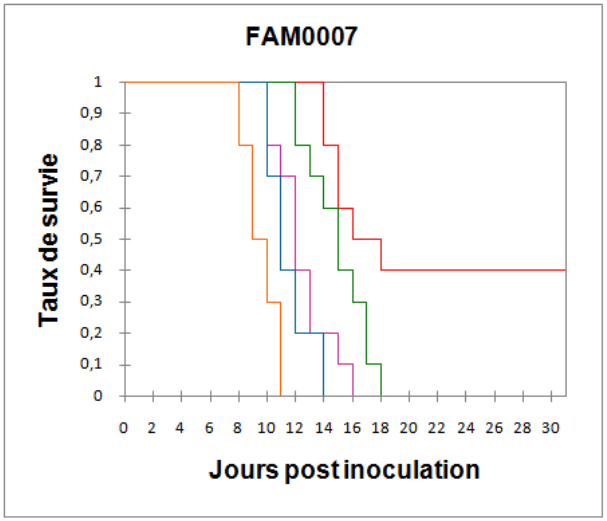

RH (typeI)
PRU (type II)
VEG (type III)
WAY
GRO
MEL
Taux de survie
Jours post inoculation
5
50
500
5000
50000

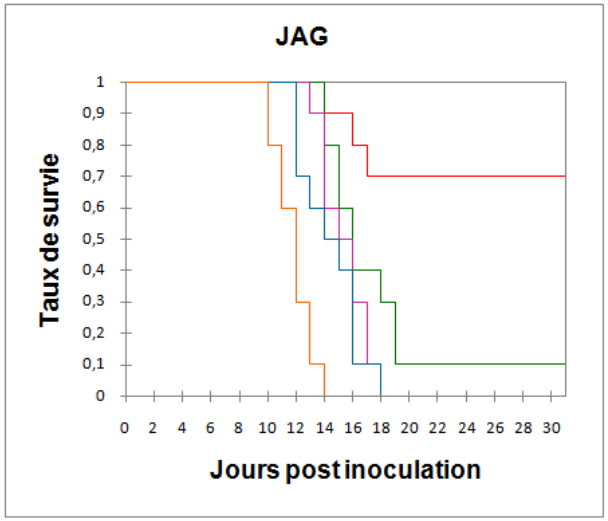

AKO
Taux de survie
Jours post inoculation


TOJ
Taux de survie
Jours post inoculation


FAM0001
Taux de survie
Jours post inoculation


FAM0002
Taux de survie
Jours post inoculation


FAM0007
Taux de survie
Jours post inoculation


JAG
Taux de survie
Jours post inoculation

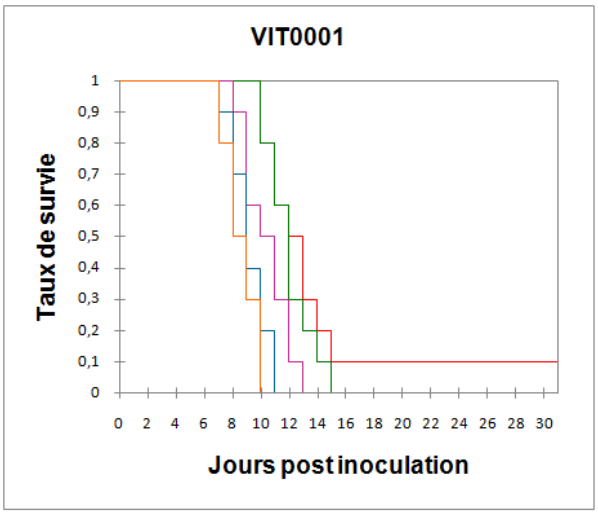


Figure 24 : Courbes de mortalité des souris après injections de doses croissantes de tachyzoïtes
La survie a été suivie pendant 31 jours après l'injection et les données ont été tracées sous forme de courbes de Kaplan-Meier (signification statistique des courbes de survie entre la souche RH et les autres, P≤0,001).

Les données sont exploitées dans le tableau ci dessous (**Tableau 6**).

Pour la souche RH, la mortalité de la totalité de la population de souris intervient avec la dose de tachyzoïtes injectés la plus faible soit 5. La souche GRO a ce même comportement. Nous verrons par la suite que, malgré cette mortalité accrue, la virulence de cette souche sera jugée moins importante que d'autres en raison du temps de survenue de la mort. En ce qui concerne la souche PRU, on atteint 60% de mortalité avec la plus grande dose (5.10^4 tachyzoïtes injectés) et 40% pour la souche VEG.

Pour les souches guyanaises, le taux de mortalité avec 5 tachyzoïtes injectés est compris entre 40% (FAM0007) et 90 % (VIT0001). Avec 50 tachyzoïtes, 2 souches (VIT0001 et FAM0002) ont 100% de mortalité. Pour les autres souches, ce taux varie entre 80% et 90%. Et avec 5.10^2 tachyzoïtes injectés, la totalité des souches guyanaises ont une mortalité de 100%

Tableau 6 : Pourcentage de mortalité chez les souris inoculées
après 31 jours d'expérimentation.
Pour chaque groupe, 10 souris ont été inoculées

		Souches de *T. gondii*												
		RH	PRU	VEG	WAY	GRO	MEL	AKO	TOJ	FAM 0001	FAM 0002	FAM 0007	JAG	VIT 0001
Tachyzoïtes injectés	5.10^0	100	20	0	50	100	60	60	70	40	60	40	70	90
	5.10^1	100	40	10	90	100	80	90	90	80	100	90	90	100
	5.10^2	100	40	10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5.10^3	100	50	30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5.10^4	100	60	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

D'autre part, le délai de survenue de la mort de la souris varie aussi beaucoup en fonction de la souche (**Tableau 7**). Pour la souche RH, avec des doses comprises entre 5 et 5.10^4 tachyzoïtes, la moyenne des jours de survie après inoculation varie entre 10,4 et 7,6 jours, elle est comprise entre 19,5 et 14,5 pour la souche PRU. La moyenne de survie pour la souche la moins virulente (VEG) est comprise entre 23 et 19 jours pour des doses comprises entre 50 et 5.10^4 tachyzoïtes. La dose avec 5 tachyzoïtes n'a pas engendré de mortalité chez les souris.

Pour les souches guyanaises, la mortalité intervient en moyenne entre 12,1 jours (souche VIT0001) et 19,5 jours (souche GRO) après une injection de 5 tachyzoïtes et entre 8,6 jours (souche VIT0001) et 13,8 jours (souche TOJ) après une injection de 5.10^4 tachyzoïtes.

Pour revenir à la souche GRO, on a vu que son taux de mortalité était très important même avec de très faibles doses. Cependant, il faut aussi noter que pour arriver à ce résultat, il faut attendre en moyenne 19,5 jours, alors qu'il ne faut que 10,4 jours pour la souche RH (soit 1,9x moins de temps). C'est pour cela que la souche GRO n'est pas considérée comme aussi virulente que la souche RH.

Tableau 7 : Moyenne des jours de survie chez les souris inoculées
après 31 jours d'expérimentation.
Entre parenthèses, l'intervalle de confiance à 95%. Pour chaque groupe, 10 souris ont été inoculées.

		Souches de *T. gondii*												
		RH	PRU	VEG	WAY	GRO	MEL	AKO	TOJ	FAM 0001	FAM 0002	FAM 0007	JAG	VIT 0001
Tachyzoïtes injectés	5.10^0	10,4 (0,5)	19,5 (1,0)	NR	15,4 (1,5)	19,5 (1,9)	14,2 (1,2)	13,3 (2,0)	15,7 (1,8)	13,3 (0,9)	15,8 (1,7)	15,3 (1,2)	15,7 (1,5)	12,1 (1,2)
	5.10^1	10 (0,3)	18,3 (2,2)	23 (-)	13,6 (0,5)	16,5 (1,0)	13,8 (1,0)	13,2 (1,2)	14,4 (1,1)	14,0 (1,2)	15,6 (1,3)	14,9 (1,3)	16,2 (1,3)	12 (1,0)
	5.10^2	9,4 (0,7)	16,8 (3,0)	21 (-)	12,2 (1,0)	15,3 (0,7)	12,0 (0,7)	12,8 (1,7)	14,3 (1,1)	13,4 (0,9)	14,7 (1,5)	12,4 (1,2)	15,4 (1,0)	10,4 (1,0)
	5.10^3	8,8 (0,7)	16,2 (3,9)	20,3 (3,5)	10,9 (0,5)	14,0 (0,7)	11,1 (0,9)	11,5 (1,0)	13,9 (1,3)	12,6 (1,8)	14,8 (1,6)	11,5 (0,9)	14,4 (1,3)	9,2 (0,8)
	5.10^4	7,6 (0,7)	14,5 (2,8)	19,0 (3,8)	9,4 (0,5)	12,1 (0,5)	8,9 (0,9)	10,3 (1,4)	11,7 (1,7)	11,9 (0,9)	13,8 (1,5)	9,6 (0,7)	11,8 (0,8)	8,6 (0,7)

NR : pas de souris mortes
(-) : pas de calcul de l'intervalle de confiance car mort d'une seule souris.

II. 1. 2. 4. Détermination de la DL_{50} et DL_{99}

Pour déterminer la DL_{50} et la DL_{99}, nous avons comptabilisé le nombre de souris mortes au bout des 31 jours d'expérimentation pour chaque souche injectée pour obtenir les graphiques du taux de mortalité en fonction du (log) du nombre de tachyzoïtes injectés. (**Figure 25**).

Les courbes des souches de référence montrent bien les différences de virulence de ces souches chez la souris. Les profils sont bien définis pour la souche virulente (type I), la souche de virulence intermédiaire (type II) et la souche non virulente (type III). Lorsque l'on compare ces courbes à celles obtenues par les souches guyanaises, on constate que les profils se rapprochent du profil de la souche RH, mettant en avant le caractère virulent des souches guyanaises, quelles soient isolées de patient ou de la faune domestique ou sauvage.

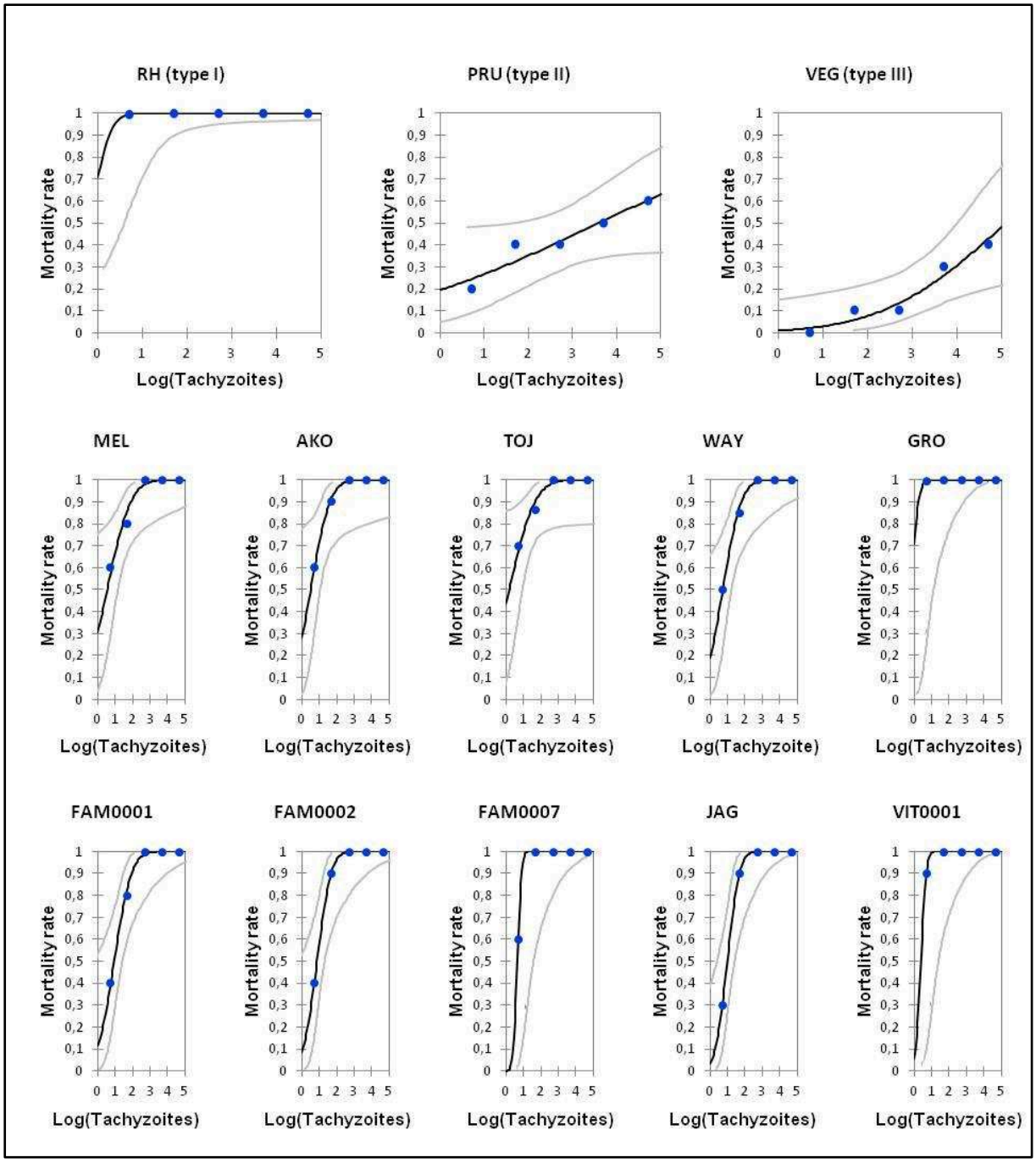


Figure 25 : Courbes de détermination de la DL_{50} et de la DL_{99}
Courbes de mortalité utilisant le modèle Probit (noir). Intervalle de confiance à 95% (gris) ($P \leq 0.005$)

A l'aide de l'équation de la droite calculé par le logiciel, on peut déterminer le nombre de tachyzoïtes nécessaire pour avoir 50% et 99% de mortalité pour chaque souche (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Détermination de la DL_{50} et de la DL_{99}

	Souche de *T. gondii*												
	RH	**PRU**	**VEG**	**WAY**	**GRO**	**MEL**	**AKO**	**TOJ**	**FAM 0001**	**FAM 0002**	**FAM 0007**	**JAG**	**VIT 0001**
DL50	1	3933	126273	5	1	3	3	2	8	7	4	10	2
DL99	4	2.10^{13}	$1{,}5.10^{10}$	465	7	1018	327	745	561	217	12	182	9

Si l'on compare les données de la DL_{50} pour les souches de référence RH (type I), PRU (type II) et VEG (type III) avec la littérature, on constate que les valeurs obtenues sont proches des valeurs décrites (Sibley et al. 1992). En ce qui concerne la DL_{99}, la valeur pour la souche RH est également proche de ce qui est décrit dans la littérature. En revanche, les valeurs que nous trouvons pour les souches PRU et VEG sont plus élevée que dans la littérature qui sont respectivement de 10^3 à 10^5 et $>10^5$. N'ayant pas été jusqu'à ces valeurs limites, nous n'avons que l'interpolation graphique pour calculer notre DL_{99}. Cependant, cela ne remet pas en cause la validation de nos résultats qui est corroborée par les valeurs de la souche RH. De plus, la méthodologie mise en place permet d'éliminer une éventuelle erreur de manipulation (vérification de la dose sur le produit injecté ainsi que de la présence de Toxoplasma sur les souris mortes par PCR temps réel).

Les valeurs des DL_{50} pour les souches isolées en Guyane (patients et animaux) sont comprises entre 1 et 10 tachyzoïtes, ce qui est très proche de la valeur de la souche RH (de type I) et très éloigné des valeurs des 2 autres souches de références (3933 pour la type II et 126273 pour la type III). La DL_{50} la plus faible est de 1 tachyzoïte (pour la souche GRO) et la plus élevée est de 10 (pour la souche JAG).

Les valeurs des DL_{99} sont plus éloignées du type I mais restent très faibles en comparaison avec les souches de type II et III puisqu'elles sont comprises entre 7 et 1018 tachyzoïtes. Pour les souches isolées de patients, la souche la plus virulente pour la souris est la souche GRO avec une DL_{99} de 7 tachyzoïtes. Pourtant si l'on regarde le tableau clinique, c'est avec la souche TOJ que la symptomatologie est la plus marquée avec atteinte multiviscérale et décès du patient, alors que la souche GRO a donné des symptômes graves mais plus 'modérés' de type hépatite aigüe isolée. Des facteurs autres que les critères parasitaires pourraient intervenir modulant ainsi l'évolution de la maladie tels que les facteurs de l'hôte (immunitaires, génétiques…). La prise en compte du temps moyen de survie est également à prendre en considération pour prédire le degré de virulence des souches (**Tableau 7**). Les DL_{99} des autres souches sont comprises entre 217 tachyzoïtes pour AKO et 1018

tachyzoïtes pour MEL. Pour les souches isolées d'animaux, la souche la plus virulente est VIT0001 avec une DL_{99} de 9. Les autres souches animales ont des DL_{99} comprises entre 12 (FAM0007) et 561 tachyzoïtes (FAM0001).

Ces valeurs montrent que toutes les souches guyanaises (humaines et animales) semblent être un modèle plus proche de la souche RH qu'avec les 2 autres souches de référence. De plus, ces paramètres semblent donner une indication très globale du niveau de virulence et permettrait de classifier les souches entre elles en souches virulentes et non virulentes mais ne semble pas corrélé avec la gravité du tableau clinique. D'autres facteurs tels que génétique humaine, la réponse immunitaire pourraient intervenir.

II. 1. 2. 5. Quantification des tachyzoïtes dans les cœurs de souris

A la **Figure 26**, on constate que pour chaque souche, quelque soit la dose injectée, le dosage du nombre de tachyzoïtes présents dans le cœur des souris après l'expérimentation révèle une quantité dans la même échelle de grandeur. Ainsi, la quantité de tachyzoïtes détectées pour la souche RH dans 25 mg de cœur, varie entre 48563 et 83092, pour la souche PRU, entre 8390 et 17528 et pour VEG entre 348 et 1629. On pourrait donc penser que la souche VEG est plus virulente que la souche RH car elle peut tuer une souris en se multipliant moins rapidement. Cependant, il faut également se reporter au tableau des jours de survie des souris (**Tableau 7**). Si l'on compare les souches RH et VEG, à la mort de la souris pour une dose injectée de 5.10^4 tachyzoïtes, il y a beaucoup plus de tachyzoïtes de RH que de VEG (83092 vs. 1629, soit 51x plus). VEG serait donc plus virulent car il faut moins de tachyzoïtes pour tuer une souris. Cependant, il faut, en moyenne, pour cette dose injectée, 7,6 jours à la souche RH pour tuer une souris contre 19,0 jours pour la souche VEG, soit 2,5x plus de temps. La souche RH a donc mis 2,5x moins de temps que la souche VEG pour tuer une souris, en se multipliant 51x plus vite.

On retrouve pour les souches guyanaises, des quantités qui sont globalement plus élevées que la souche PRU ou au minimum équivalent : 7014 pour la souche JAG pour 50 tachyzoïtes injectés et des doses maximales proches des quantités produites par la souche RH : 58889 tachyzoïtes pour la souche GRO pour une dose injectée de 500 tachyzoïtes. Dans ces cas aussi, la prise en compte du temps de survie de la souris est importante. Si l'on prend la moyenne de survie des souris pour les 10 souches guyanaises pour une dose injectée de 5.10^4, on obtient 10,8 jours. Il faut 1,3x plus de temps pour PRU pour arriver au même résultat et 1,8x plus pour la souche VEG.

Ce qui est également intéressant, c'est le nombre moyen (moyenne du nombre de tachyzoïtes sur les 5 doses injectées pour 25 mg de cœur) de tachyzoïtes détectés par qPCR présents dans le cœur des souris mortes en comparaison avec le nombre de tachyzoïtes présents chez les souris qui ont survécu 31 jours post infection (**Figure 27**). Exception faite des souches RH et GRO pour lesquelles aucune souris n'a survécu, pour ce qui concerne les autres souches, le nombre de tachyzoïtes est bien inférieur pour les souris survivantes par rapport au nombre de tachyzoïtes retrouvé dans les souris mortes. Pour la souche PRU, on retrouve en moyenne 11482 tachyzoïtes pour 25 mg de cœur pour les souris mortes contre seulement 174 tachyzoïtes pour les souris survivantes, soit 65x moins. L'écart est moins important pour la souche VEG, pour laquelle on retrouve, en moyenne, 758 tachyzoïtes pour les souris mortes contre 274 tachyzoïtes pour les souris survivantes soit 'seulement' 2,7x moins. Pour les souches guyanaises, cette quantité moyenne de tachyzoïtes varie de 8092 pour la souche JAG à 40746 pour la souche GRO pour les souris mortes de l'infection. On a donc globalement une multiplication plus rapide de ces souches par rapport aux souches PRU et VEG, sans pour autant avoir la même quantité que la souche RH (59060 tachyzoïtes/25mg de cœur). Au contraire, en ce qui concerne le nombre de tachyzoïtes chez les souris vivantes après 31 post infection, la quantité varie entre 55 tachyzoïtes pour la souche WAY et 564 tachyzoïtes pour la souche TOJ. En comparaison avec les souches PRU (174 tachyzoïtes) et VEG (274 tachyzoïtes), ces quantités sont relativement proches. Il y a donc eu très peu de multiplication au niveau du cœur.

On pourrait donc penser que le système immunitaire de l'hôte a pu réguler l'infection empêchant ainsi la multiplication du parasite. Il faut cependant prendre en compte que pour les souches guyanaises, le nombre de souris ayant survécu après 31 jours post infection n'ai que de 53 ce qui représente que 10,5% de la population globale (toute souche et doses confondues).

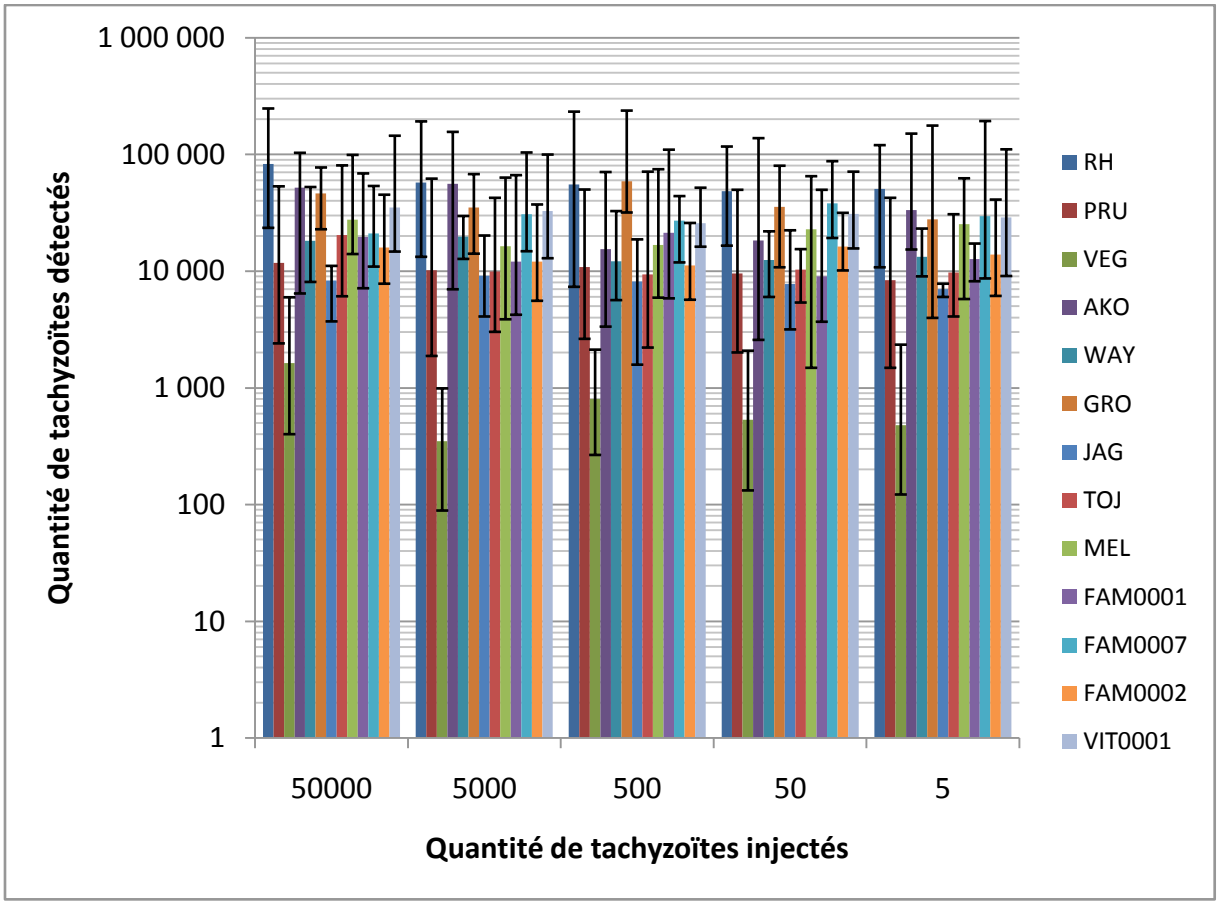


Figure 26 : Quantité de tachyzoïtes dans 25 mg de cœur en fonction de la dose de tachyzoïtes injectés.

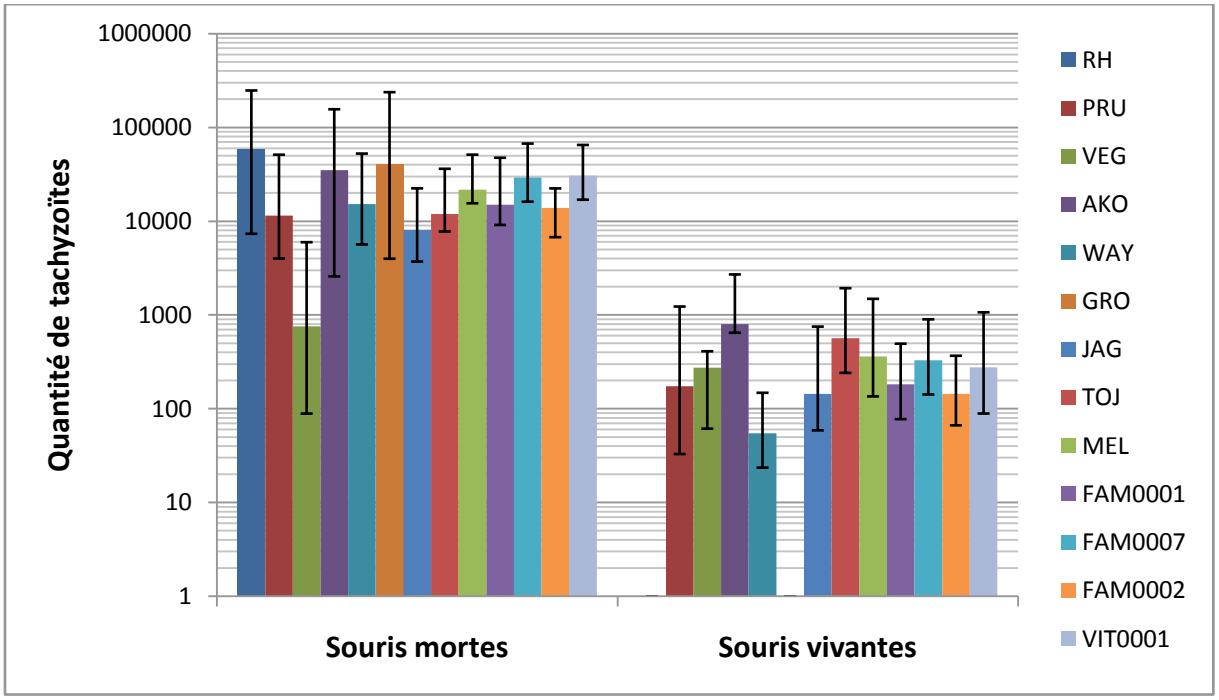


Figure 27 : Quantité moyenne de tachyzoïtes pour 25 mg de cœur en fonction de la mort ou de la survie des souris injectées.

II. 1. 2. 6. Score de virulence

La détermination de la DL_{50} et de la DL_{99} nous informe sur le nombre de tachyzoïtes nécessaire pour tuer une population de souris au bout d'un certain temps. Cependant, d'autres paramètres peuvent influer sur cette virulence comme le nombre de souris injectées, délai de survenu de la mort ou nombre de souris mortes avec une dose définie. Le calcul du SV prend en compte tous ces paramètres (**Figure 28**).

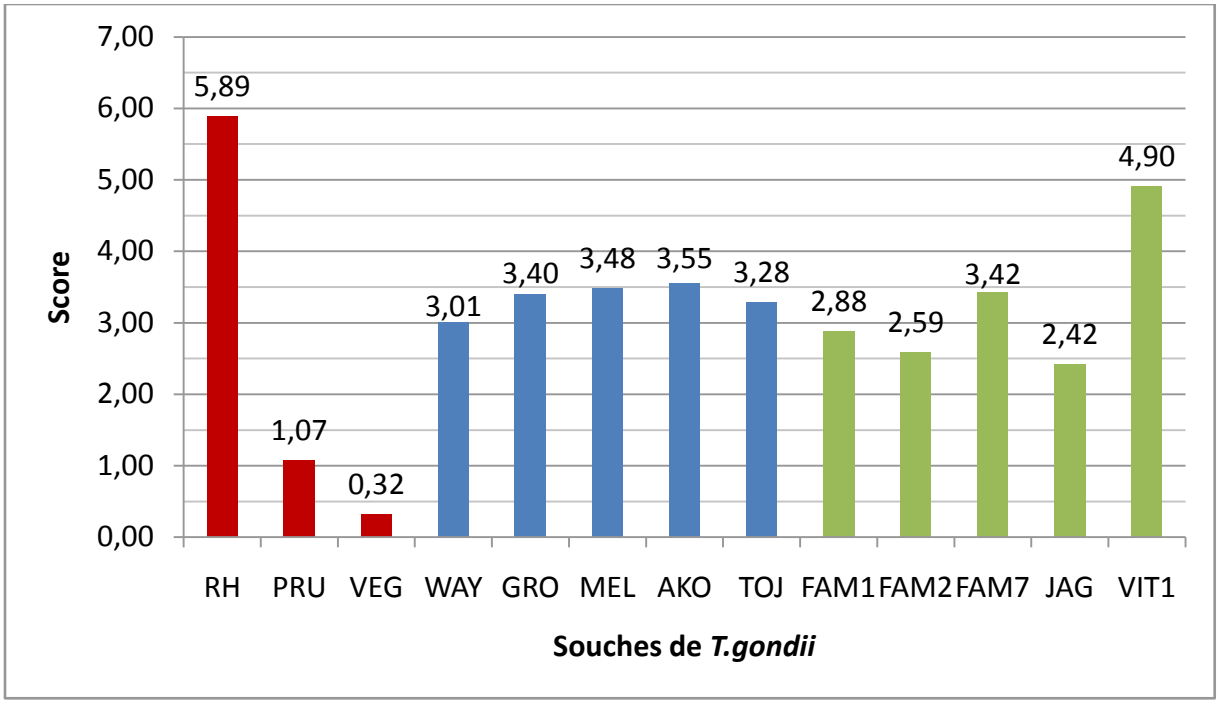


Figure 28 : Calcul du score de virulence
En rouge sont représentées les souches de référence, en bleu les souches isolées de patients et en vert les souches isolées d'animaux.

La souche RH, considérée comme très virulente, obtient un score de 5,89 alors que les souches PRU et VEG avec des virulences intermédiaires ou avirulentes ont des scores respectivement de 1,07 et de 0,26. Le score calculé pour les souches humaines a été classé en fonction du niveau de gravité du tableau clinique allant de la souche WAY sans gravité clinique à la souche TOJ en relation avec un tableau très sévère ayant entrainé la mort. Si on note une augmentation du score pour les 4 premières souches pouvant être corrélée avec la gravité du tableau clinique, il n'en est rien pour la dernière des souches qui a un score plus faible (TOJ) que AKO, ce qui la placerait parmi les souches ayant un tableau clinique les moins sévères. Ceci conforte l'idée que d'autres facteurs que le facteur parasitaire interviennent dans le mécanisme physiopathologique de la maladie. De même, ces résultats indiquent que si le score précise mieux le critère virulence des souches les unes par rapport aux autres, il n'est pas suffisant pour être corrélé à la gravité du tableau clinique.

Les souches isolées d'animaux ont des scores plus hétérogènes. La valeur la plus basse étant de 2,42 pour la souche JAG (type Amazonien) issue d'un environnement sauvage et la plus élevé est de 4,90 pour la souche VIT0001 (type Caribéen intermédiaire) issue d'un animal sauvage mais proche d'un environnement anthropisé (zone forestière). La souche FAM0007 (type Amazonien) est issue d'un chien dans une zone anthropisée et a un score comparable à ceux des souches humaines tandis que les souches FAM0001 et FAM0002 (type Caribéen I et II) également issues de chiens d'une zone anthropisée présentent des score intermédiaires.

Ce score présente un certain intérêt pour classer les souches bien qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre le score et la sévérité clinique chez les patients. Cependant, ce score permet une meilleure vue d'ensemble de la virulence des souches. D'autres essais pourraient venir corroborer ces premiers résultats et notamment le fait de réussir à obtenir et de tester une même souche présente dans l'environnement (eau, gibier) et ayant contaminée un patient. Il serait intéressant de voir si le score obtenu est identique ou s'il existe des différences de virulence en fonction de l'hôte.

II. 2. ANALYSE GENETIQUE DE MARQUEURS MOLECULAIRES

II. 2. 1. Méthodologie

II. 2. 1. 1. Séquençage des microsatellites

II. 2. 1. 1. 1. Extraction d'ADN

L'ADN est extrait à partir de 200 µl de culture de T. gondii sur HFF-1 à l'aide du DNeasy® Blood and Tissue Kit de Qiagen® (Hilden, Germany) suivant les recommandations du fabriquant. L'ADN est élué dans 200µl de tampon AE (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

II. 2. 1. 1. 2. PCR classique

Une étape d'amplification des fragments microsatellites est nécessaire avant leur séquençage. Des amorces spécifiques (Applied Biosystems™ by Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) des 13 microsatellites (**Annexe 3**) sont utilisées. Elles sont classées en 2 groupes : 8 pour des marqueurs de typage (typing markers) et 5 pour des marqueurs 'd'empreintes digitales' (fingerprinting markers).

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 50µl en utilisant le kit commercial Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA). En résumé, chaque réaction contient 5 µl d'ADN d'une des souches de T. gondii, 25 µl de Phusion™ Master Mix, 0,2 µM de chacun des 2 amorces et une quantité suffisante d'H_2O pour 50 µl. La PCR est réalisée avec une étape de dénaturation initiale de 10 s. à 98°C., suivi par 35 cycles d'amplification (chacun de 5 s à 98°C., 10 s à 60°C. et 30 s. à 72°C.) et une extension finale de 1 min à 72°C.

Les amplicons sont détectés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% contenant du BET permettant la révélation sous lumière UV. Le séquençage des 2 brins de ces amplicons a été réalisé après purification (Beckman Coulter Genomics, Takeley, GB). Les séquences nucléotidiques ont été alignées en utilisant le programme Clustal X 2.0 (Larkin et al. 2007).

II. 2. 1. 2. Séquençage des gènes de virulence

II. 2. 1. 2. 1. Extraction d'ADN

Nous utilisons le même ADN qu'extrait ci-dessus (**cf.II. 1. 1. 6. 1**).

II. 2. 1. 2. 2. PCR classique et séquençage

La PCR a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (**cf.** II. 2. 1. 1. 2). Des amorces spécifiques (Applied Biosystems™) utilisées permettent l'amplification de 8 gènes potentiellement impliqués dans la virulence (**Annexe 4**), répartis en 4 groupes de protéines : les ROP, les GRA, les SAG et les MIC (**Figure 20**).

Les amplicons sont détectés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% contenant du BET permettant la révélation sous lumière UV. Le séquençage des 2 brins de ces amplicons a été réalisé après purification (Beckman Coulter Genomics, Takeley, GB).

II. 2. 1. 2. 3. Arbre phylogénétique

Les séquences nucléotidiques des différents gènes de virulence ont été concaténées puis ont été alignées à l'aide de l'algorithme Clutal O intégré dans le programme SEAVIEW 4.2.12 (Gouy et al. 2010). Les analyses phylogénétiques ont été effectuées en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle General Time Reversible (GTR) avec un taux de distribution gamma des sites invariants (G + I). Pour vérifier la robustesse de chaque nœud, la méthode des bootstrap (1000 pseudo-répliques) a été utilisée.

II. 2. 1. 3. Expression de gènes

II. 2. 1. 3. 1. Culture des tachyzoïtes

Des cellules HFF-1 sont cultivées dans des flasques de 25 cm² contenant 4 ml de milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) et L-glutamine supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, un mélange pénicilline (100 U/ml) – streptomycine (100 µg/ml) et incubées à 37°C en atmosphère humide sous 5 % de CO_2.

Les cellules HFF-1 confluentes sont ensuite infectées avec $2.5x10^6$ tachyzoïtes puis récupérées à l'aide d'un grattoir toutes les 24h. de T=0 à T=168h. L'ensemble est transvasé dans un tube conique de 5 ml et centrifugé 8 min. à 1400 rpm/min. Le surnageant est ensuite éliminé.

II. 2. 1. 3. 2. Extraction de l'ARN total

L'extraction de l'ARN total (ARNt) du culot est obtenu à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini (QiagenGmbH, Hilden, Germany) qui permet d'enlever l'ADN génomique, suivant les recommandations du fabriquant. L'ARNt est élué dans 50 µl d'eau sans RNase et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

II. 2. 1. 3. 3. Analyse de l'ARN total

L'ARNt purifié est analysé avec le BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La puce RNA 6000 Nano Assay permet de doser l'ARNt mais également de vérifier l'intégrité de cet ARNt en appliquant un score RIN (=RNA Integrity Number). Ce score varie entre 1 (ARNt très dégradé) et 10 (ARNt non dégradé). C'est un calcul arithmétique incluant le ratio 28S/18S, la région avant les pics, l'aire des signaux et leur intensité. Pour valider l'intégrité des ARNt, le RIN doit être supérieur à 8.

II. 2. 1. 3. 4. Reverse Transcription

L'ARNt est ajusté à 2 µg puis est reverse-transcrit en ADNc avec 4µl de SuperScript® VILO™ MasterMix (Invitrogenby Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) dans un volume final de 20 µl. L'incubation se fait 10 min à 25°C, 60 min à 42°C puis 5 min à 85°C. Les ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

II. 2. 1. 3. 5. Quantification par PCR en temps réel

Les amorces et les sondes Taqman® ont été conçues en utilisant le logiciel Primer Express® 3.0 (Applied Biosystems™). Les séquences du système utilisé sont résumées dans l'**Annexe 5**.

Les réactions de qPCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl contenant 1 × TaqMan® Gene Expression Master Mix avec Uracyl-DNA-glycosylase (Applied Biosystems™), 0,9 µM de chaque amorce, 0,25 µM de la sonde, 2µl de matrice d'ADNc et 6µl d'H_2O. La qPCR est réalisée avec une étape d'activation du système Uracyl-DNA-glycosylase à 50°C pendant 2 min, suivi par une étape de d'activation de la Taq / désactivation du système Uracyl-DNA-glycosylase à 95°C pendant 10 min puis de 40 cycles d'amplification (chacun de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C). La détection de la réaction s'effectue après chaque cycle d'amplification sur le 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems™).

Pour chaque système (amorces et sonde), un test d'efficacité a été effectué sur une gamme d'ADN de Toxoplasma de dilution croissante. Ce test permet de vérifier l'efficacité de l'amplification (idéalement, doublement des nombres de brins à chaque cycle). La formule $E=e^{(-1/\text{-pente})}-1$ donne une valeur comprise entre 0 et 1. L'efficacité E doit être supérieur à 0,8 et se rapprocher au plus près de 1 pour considérer que la PCR fonctionne bien.

En quantification relative, l'expression d'un gène cible est exprimé par rapport à un gène de référence d'expression stable quelques soient les conditions. Ces gènes de références sont appelés des gènes « de ménage ». Il en existe plusieurs dont les gènes de la β-actine et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Après plusieurs tests, il s'est avéré que l'expression de la GAPDH variait légèrement par rapport à l'actine au court du temps. Afin de pouvoir normaliser les différents taux d'expression, la GAPDH a été écartée.

II. 2. 1. 4. Puces à ADN

II. 2. 1. 4. 1. Méthodologie

L'expression des gènes en utilisant la qPCR permet de visualiser l'expression d'1 gène dans plusieurs souches à un temps (ou des temps) donné(s). De plus, il faut que ce gène soit connu afin de pouvoir synthétiser des amorces et sondes qui s'alignent sur ce gène.

L'utilisation des puces à ADN permet de visualiser l'expression de l'ensemble des gènes pour une souche donnée. En effet, une puce permet de fixer l'ensemble des gènes d'un organisme sur une petite surface (verre ou silicium). Il existe 2 façons d'utiliser ces puces en fonction du fournisseur :

- soit en utilisant 2 séries d'ARNt (2 conditions différentes) qui sont rétrotranscriptés en ADNc. Chaque ADNc est ensuite marqué avec 1

fluorochrome différent : généralement la Cyanine 3 (Cys3) qui fluoresce dans le vert et la Cyanine 5 (Cys5) qui fluoresce dans le rouge. Dans ce cas, les 2 échantillons différents sont hybridés en simultanément sur la puce, on parle d'hybridation compétitive. Pour 1 gène donné, l'hybridation sera favorisée pour l'ADNc majoritaire. Lors de la lecture, l'excitation des 2 fluorochromes révélera soit le rouge soit le vert, ce qui indiquera dans quelle condition le gène étudié est exprimé de façon majoritaire, soit le jaune qui indiquera une expression identique dans les 2 conditions (**Figure 29**).

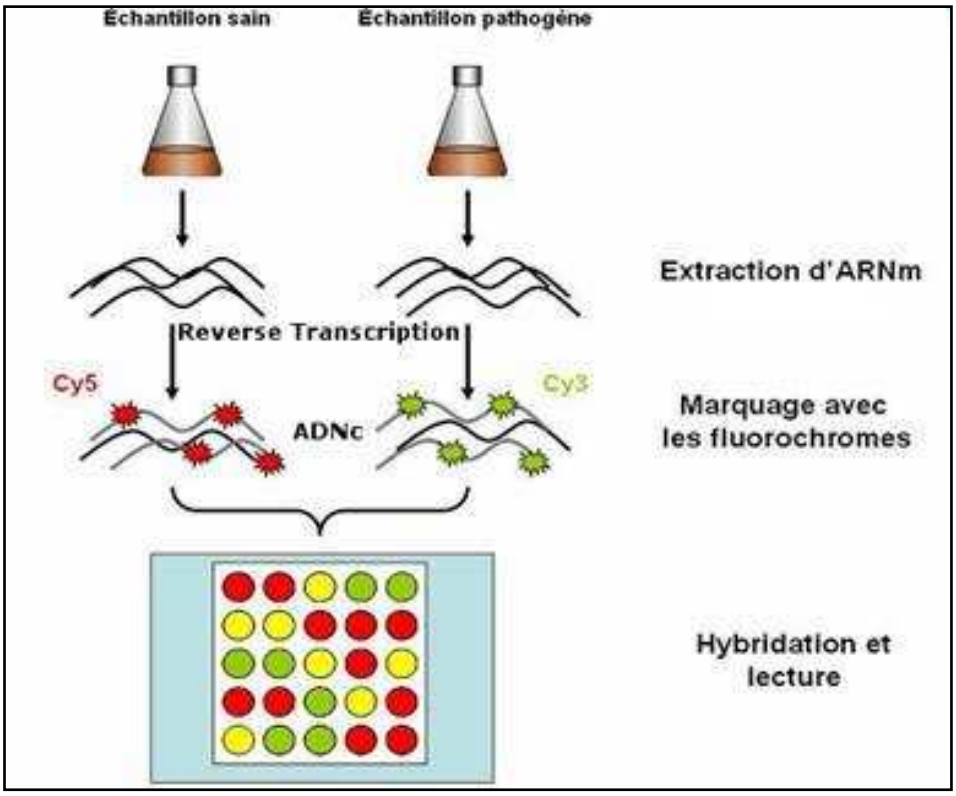


Figure 29 : Principe des puces ADN par hybridation compétitive

- soit chaque ARNt est rétrotranscrit en ADNc, marqué à la biotine. sur une puce individuelle. Lors de la révélation à la streptavidine – phycoérythrine, l'émission de lumière est proportionnelle à la quantité de cible liée à chaque position d'un gène. On peut ainsi déterminer les degrés d'expression des gènes d'une puce à l'autre, et ainsi voir quels gènes sont surexprimés ou sous exprimés en fonction des conditions, des souches, etc. C'est le cas des puces fabriquées par la société Affymetrix (**Figure 30**) qui peut contenir 25 000

spots/cm². Chaque spot a environ 20µm de diamètre. La sonde comporte entre 20 et 25 nucléotides.

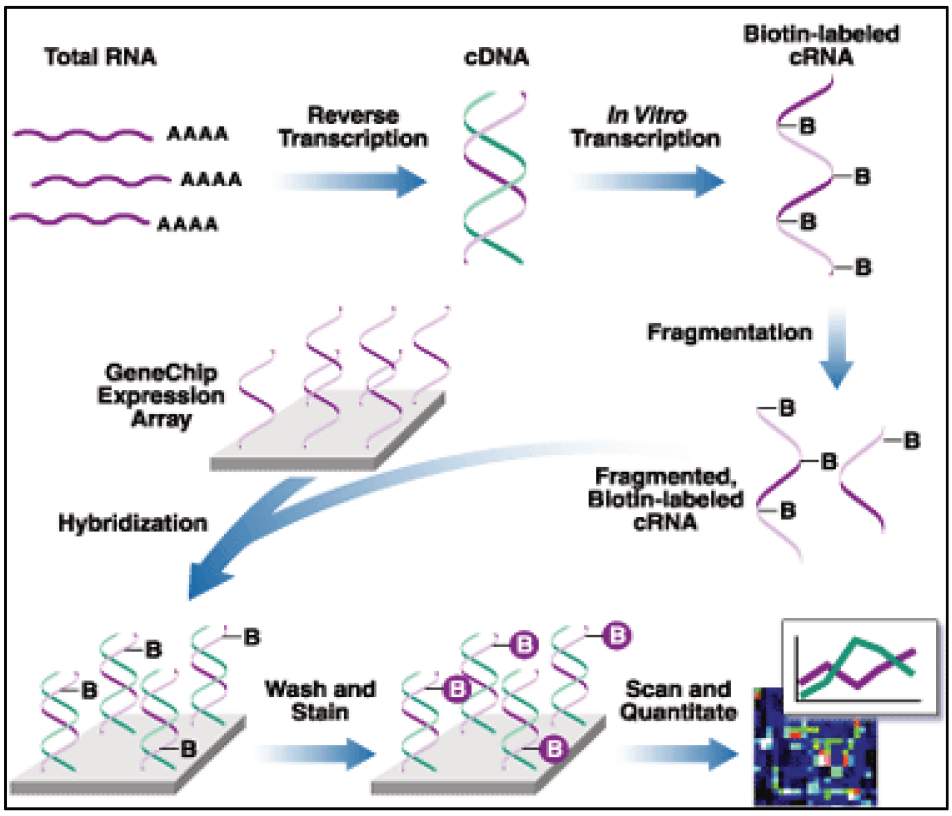


Figure 30 : Principe des puces Affymetrix

II. 2. 1. 4. 2. Utilisation des puces T. gondii

Les seules puces ADN T. gondii disponibles sur le marché sont fabriquées par l'Université de Pennsylvanie (Etats Unis) sur des puces Affymetrix : ToxoGene Chip (Bahl et al. 2010), http://ancillary.toxodb.org/docs/Array-Tutorial.html). Elle comporte plus de 226 588 sondes correspondant à 7 793 gènes (certains sont représentés plus d'une fois, ce qui porte le total à 8 058 gènes codants) ainsi que de nombreux SNP et marqueurs (**Annexe 6**). L'hybridation de ces puces ainsi que la détection des signaux nécessitent du matériel spécifique et relativement coûteux que nous n'avions pas sur place. Les échantillons d'ARN et les puces ont été acheminés sur Paris sur la plate-forme génomique de l'Institut Cochin : Genom'ic.

Les puces étant également relativement onéreuses, nous n'avons pas analysé l'expression des ARN sur plusieurs temps mais uniquement à un temps T. La sélection des ARN à analyser a été faite en fonction des résultats de l'expression des gènes. Il a fallu choisir le temps où l'expression des gènes est maximum pour les différentes souches. Pour pouvoir comparer les souches entres elles, il faut que le temps soit identique pour toutes les souches.

A 72h post infection, l'expression est optimum pour la majorité des souches. C'est donc à ce temps que les ARN seront produits et envoyés à la plate-forme de Cochin.

II. 2. 1. 4. 3. Traitement des données transcriptomiques

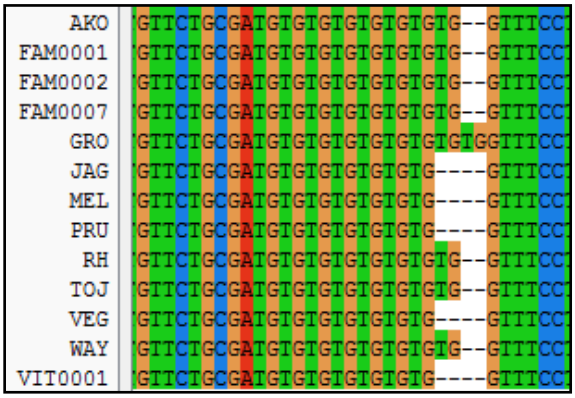
Les données brutes issues de l'image de chaque puce sont normalisées par un algorithme RMA (Robust Multi-arrayAverage). Un contrôle est effectué par ACP (Analyse en Composante Principale) et par clustering hiérarchique (analyse non supervisée). L'application du modèle statistique ANOVA à chaque gène permet une analyse supervisée. On obtient ainsi une p-value et un fold-change par comparaison entre deux groupes et par gène. Le filtrage des données sur la p-value et le fold-change permet d'obtenir la liste des gènes différentiellement exprimés (**Annexe 7** : Résumé du traitement des données transcriptomiques des puces Affymetrix par la plate-forme Genom'ic).

II. 2. 2. Résultats

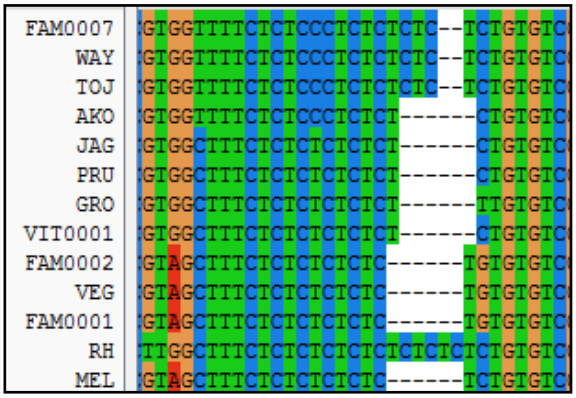
II. 2. 2. 1. Séquençage des marqueurs microsatellites

Le séquençage de ces 13 microsatellites a révélé une grande disparité entre les souches de référence et les souches de Guyane (**Figure 31**).

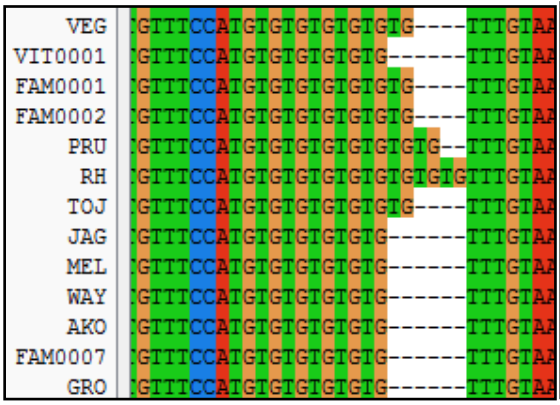
TUB2



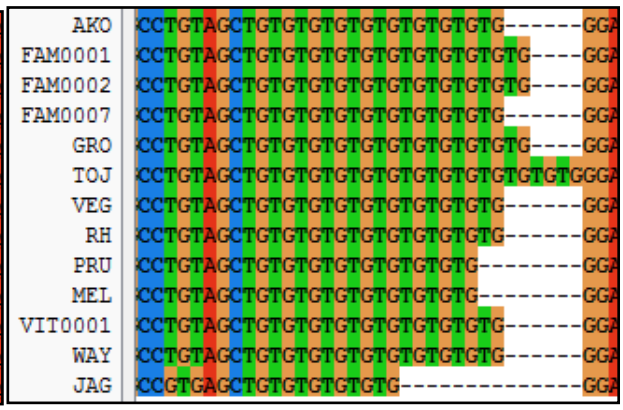
W35



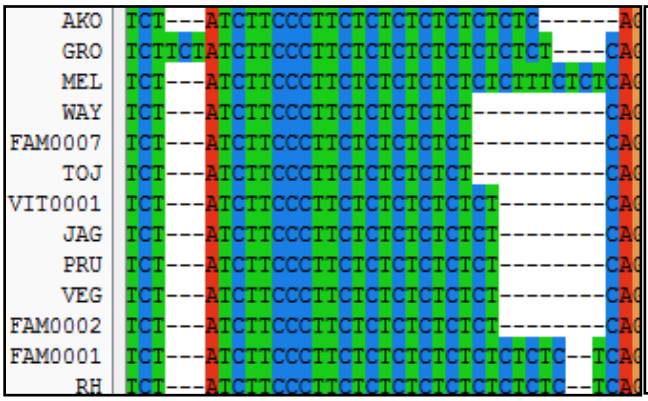
TgM-A



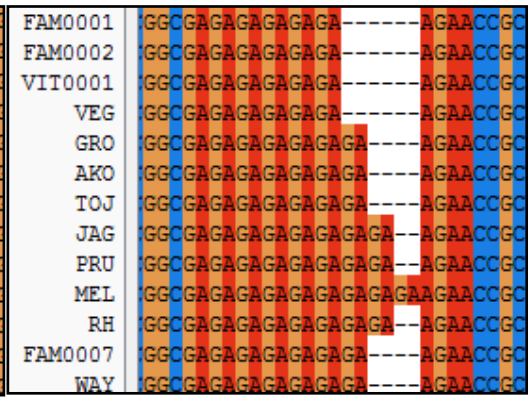
B18



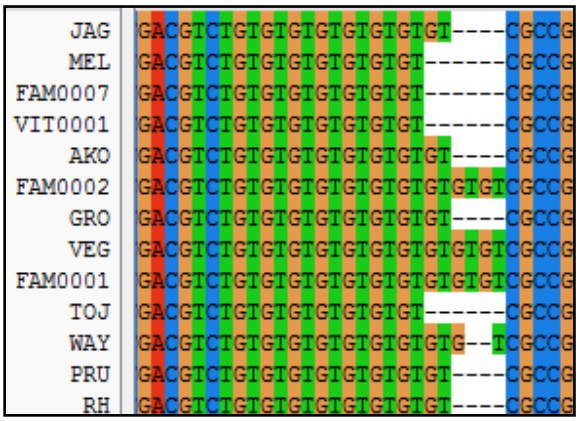
B17



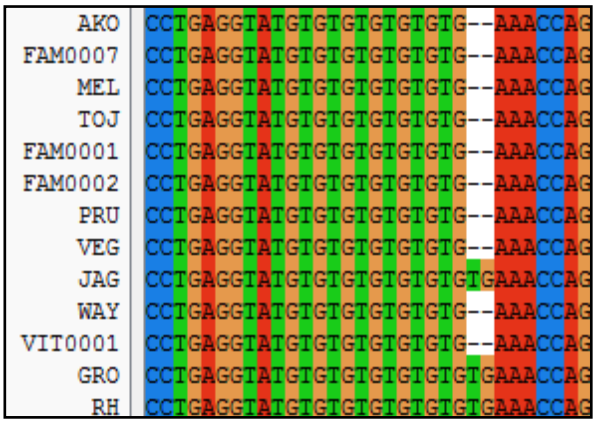
M33



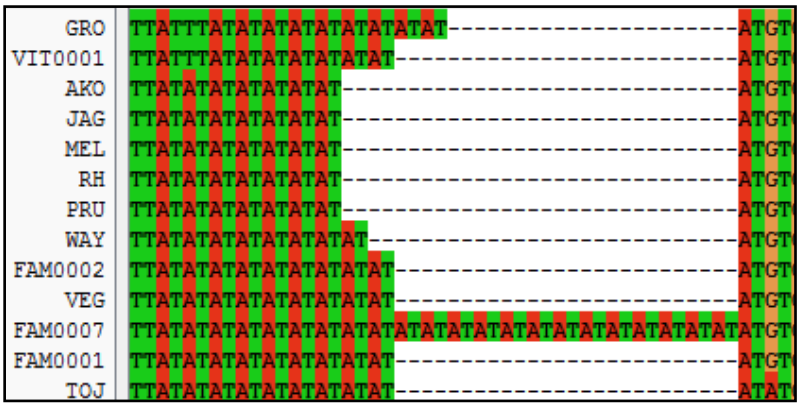
IV.1



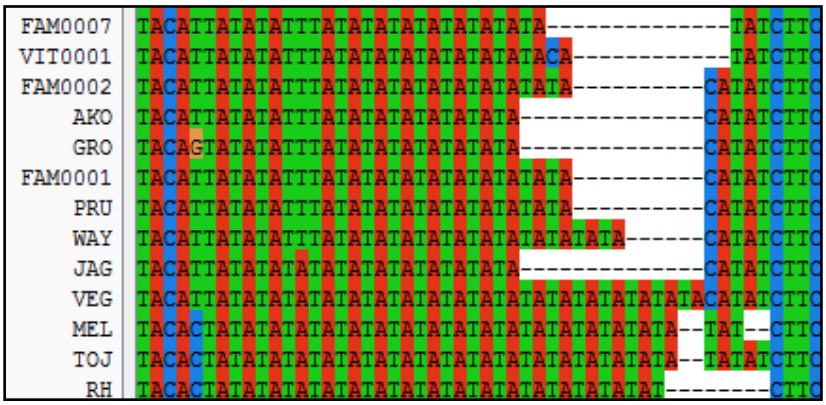
XI.1



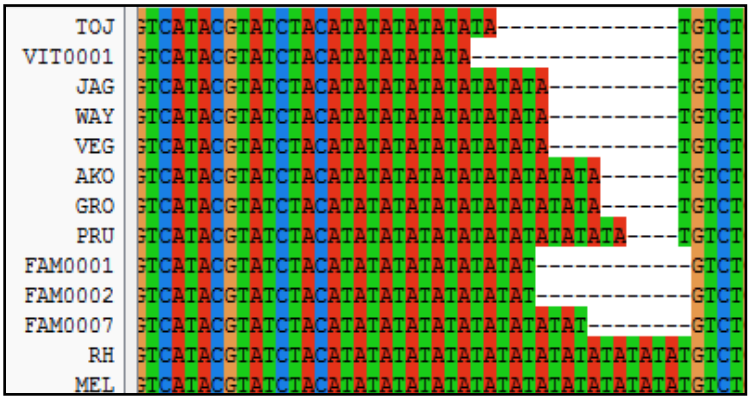
M48



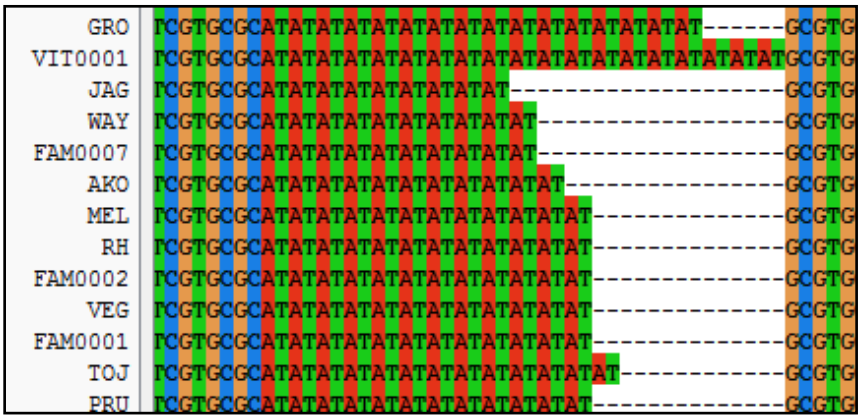
N60


FAM0007
VIT0001
FAM0002
AKO
GRO
FAM0001
PRU
WAY
JAG
VEG
MEL
TOJ
RH

N82


TOJ
VIT0001
JAG
WAY
VEG
AKO
GRO
PRU
FAM0001
FAM0002
FAM0007
RH
MEL

AA


GRO
VIT0001
JAG
WAY
FAM0007
AKO
MEL
RH
FAM0002
VEG
FAM0001
TOJ
PRU

N83

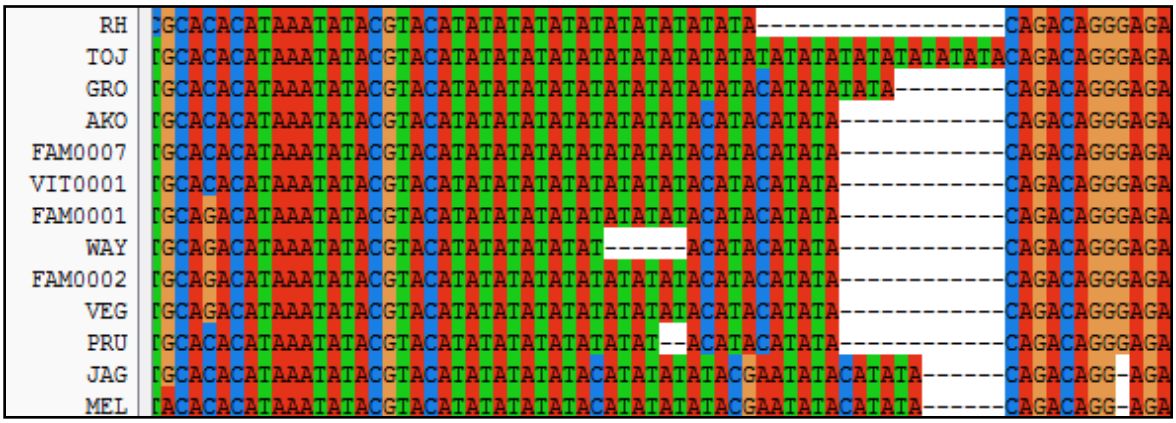


Figure 31 : Séquençage de 13 marqueurs microsatellites.

Les résultats du séquençage des microsatellites sont compilés dans le tableau suivant (**Tableau 9**). On constate que si certains microsatellites ne présentent que très peu de polymorphisme (2 à 4 groupes) comme TUB2, TgM, M33, IV.1, XI.1), la majorité a un polymorphisme plus élevé, variant de 4 groupes (B18) à 10 groupes (N60).

Si l'on compare par souche, on s'aperçoit que toutes les souches sont différentes les unes par rapport aux autres. Ainsi, pour les souches FAM0001 et FAM0002 (type Caribéen 1 et 2), on retrouve 12 microsatellites identiques sauf pour B17. Ces 2 souches ont été isolées dans un environnement anthropisé proche mais ont pourtant des génotypes légèrement différents. La souche FAM0007 (type Caribéen intermédiaire) est une souche qui a été isolée dans une région géographiquement proche de FAM0001 – FAM0002. Cependant, on ne retrouve que 3 microsatellites en commun. Il est très intéressant de constater que pour des souches isolées d'environnement proches géographiquement mais de niche écologique différente (domestique vs. sauvage), il n'y a que très peu de microsatellite en commun.

Cette analyse confirme l'extrême diversité génétique des souches circulant en Guyane française, tant celles évoluant dans le biotope rural que forestier. Une analyse sur un plus grand nombre de souches permettra une vision globale et donnera plus de puissance à ces résultats préliminaires réalisés sur un petit nombre de souches.

Tableau 9 : Longueur et composition des microsatellites

	TUB2	W35	TgM	B18	B17	M33	IV.1	XI.1	M48	N60	N82	AA	N83
RH (I)	291 (TG)8	250 (TC)10(TG)2	208 (TG)9	161 (TG)10	340 (TC)10	170 (GA)8	275 (TG)8	359 (TG)8	210 (TA)8	145 (TA)17	124 (TA)13	263 (AT)12	308 (AT)11
PRU (II)	289 (TG)7	244 (TC)7(TG)2	206 (TG)8	159 (TG)9	334 (TC)7	170 (GA)8	275 (TG)8	357 (TG)7	210 (TA)8	143 (TA)3TT(TA)10	120 (TA)11	263 (AT)12	312 (AT)8ACATAC(AT)2
VEG (III)	289 (TG)7	244 (TC)6(TG)3	204 (TG)7	161 (TG)10	334 (TC)7	166 (GA)6	279 (TG)10	357 (TG)7	214 (TA)10	153 (TA)19	114 (TA)8	263 (AT)12	314 (AT)9ACATAC(AT)2
AKO	291 (TG)8	244 (TC)3CC(TC)3(TG)2	202 (TG)6	161 (TG)10	336 (TC)8	168 (GA)7	275 (TG)8	357 (TG)7	210 (TA)8	139 (TA)3TT(TA)8	118 (TA)10	261 (AT)11	314 (AT)9ACATAC(AT)2
TOJ	291 (TG)8	248 (TC)3CC(TC)5(TG)2	204 (TG)7	167 (TG)13	332 (TC)6	168 (GA)7	273 (TG)7	357 (TG)7	214 (TA)10	151 (TA)20	110 (TA)6	265 (AT)13	326 (AT)20
MEL	289 (TG)7	244 (TC)7(TG)2	202 (TG)6	159 (TG)9	342 (TC)7TT(TC)3	172 (GA)9	273 (TG)7	357 (TG)7	210 (TA)8	149 (TA)19	124 (TA)13	263 (AT)12	319 (AT)5AC(AT)4ACGA(AT)2AC(AT)2
WAY	291 (TG)8	248 (TC)3CC(TC)5(TG)2	202 (TG)6	161 (TG)10	332 (TC)6	168 (GA)7	277 (TG)9	357 (TG)7	212 (TA)9	147 (TA)3TT(TA)12	114 (TA)8	259 (AT)10	308 (AT)6ACATAC(AT)2
GRO	293 (TG)9	244 (TC)6TT(TG)2	202 (TG)6	163 (TG)11	341 (TC)9	168 (GA)7	275 (TG)8	359 (TG)8	218 TATT(TA)10	139 (TA)3TT(TA)8	118 (TA)10	271 (AT)16	318 (AT)11AC(AT)4
JAG	289 (TG)7	244 (TC)7(TG)2	202 (TG)6	161 (TG)10	334 (TC)7	170 (GA)8	275 (TG)8	359 (TG)8	210 (TA)8	139 (TA)12	114 (TA)8	257 (AT)9	319 (AT)5AC(AT)4ACGA(AT)2AC(AT)2
FAM0001	291 (TG)8	244 (TC)6(TG)3	204 (TG)7	163 (TG)11	340 (TC)10	166 (GA)6	279 (TG)10	357 (TG)7	214 (TA)10	143 (TA)3TT(TA)10	112 (TA)7	263 (AT)12	314 (AT)9ACATAC(AT)2
FAM0002	291 (TG)8	244 (TC)6(TG)3	204 (TG)7	163 (TG)11	334 (TC)7	166 (GA)6	279 (TG)10	357 (TG)7	214 (TA)10	143 (TA)3TT(TA)10	112 (TA)7	263 (AT)12	314 (AT)9ACATAC(AT)2
FAM0007	291 (TG)8	248 (TC)3CC(TC)5(TG)2	202 (TG)6	161 (TG)10	332 (TC)6	168 (GA)7	273 (TG)7	357 (TG)7	240 (TA)23	139 (TA)3TT(TA)10	116 (TA)9	259 (AT)9	314 (AT)9ACATAC(AT)2
VIT0001	289 (TG)7	244 (TC)7(TG)2	202 (TG)6	161 (TG)10	334 (TC)7	166 (GA)6	273 (TG)7	357 (TG)7	214 TATT(TA)8	141 (TA)3TT(TA)9	108 (TA)5	277 (AT)19	314 (AT)9ACATAC(AT)2

II. 2. 2. 2. Séquençage des gènes de virulence

Huit gènes étant décrits dans la littérature comme participant à la virulence sont séquencés. Le nombre de paires de bases est variable d'un gène à l'autre :

GRA1	573 pb
GRA3	663-669 pb
MIC1	1371pb
ROP16	2124 pb
ROP18	1665 - 1671 pb
ROP38	1626 pb
SAG1	1011 pb
SAG3	1158 pb

Le séquençage a mis en évidence des divergences existent entre les gènes de virulence des différentes souches isolées en Guyane. Ces plus grandes divergences se retrouvent sur le gène GRA3 avec la perte de 6 nucléotides sur la partie 3' pour PRU (type II), MEL et JAG (**Figure 32**) et sur le gène ROP18 avec l'insertion de 3 nucléotides à 2 endroits proches (position 180 et 251) pour les souches VEG (type III), FAM0001 et FAM0002 (**Figure 33**). Le pourcentage de divergence sur les séquences nucléotidiques a été déterminé par rapport à la souche la plus virulente RH (type I) (**Figure 34**). Certains gènes ont moins de variation comme MIC1 ou ROP38 avec des pourcentages de divergence inférieurs à 0,5 %. Il en est de même pour les gènes GRA1 et SAG1 (pourcentages bas < 1 %).

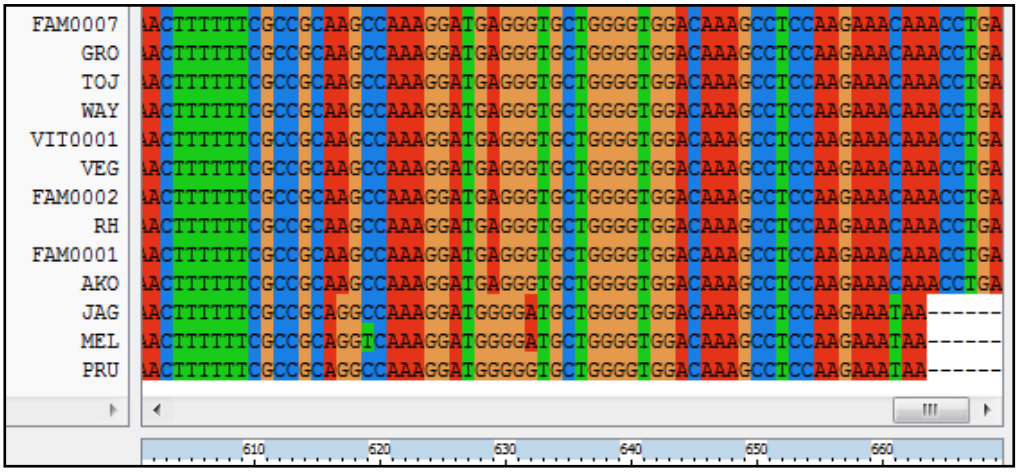


Figure 32 : Alignement du gène GRA3

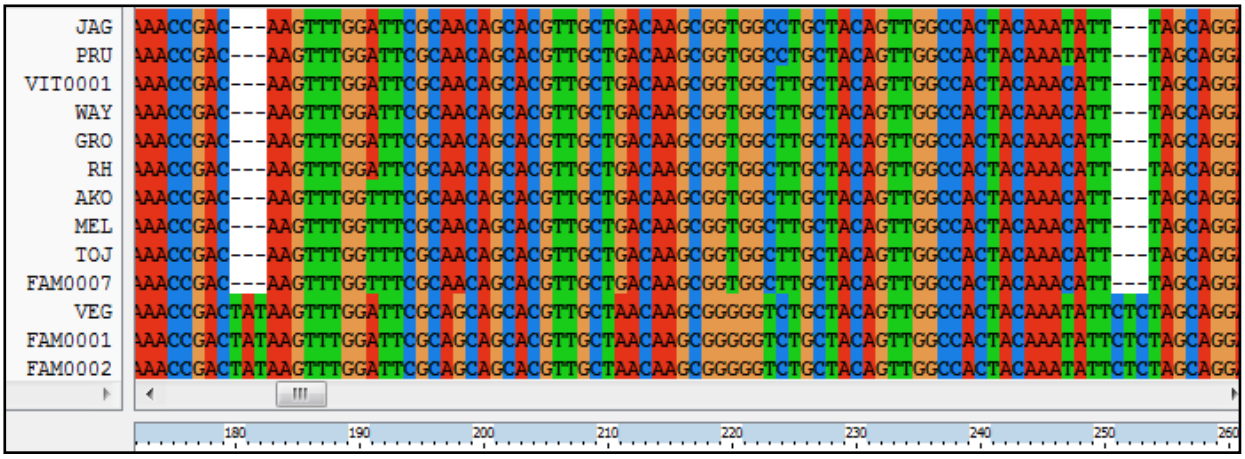


Figure 33 : Alignement du gène ROP18

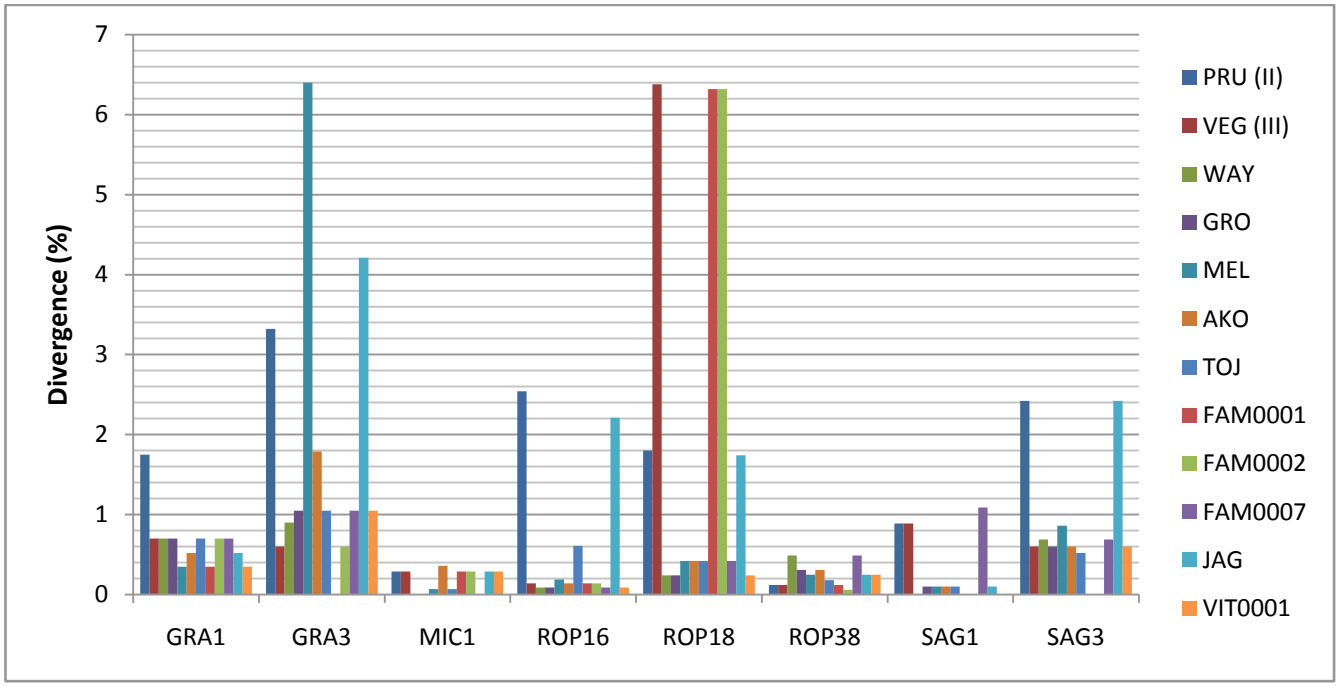


Figure 34 : Pourcentage de divergence en nucléotides par rapport à RH.

Lorsque l'on transcrit ces séquences nucléotidiques en séquences protéiques (**Figure 35**), on constate que le pourcentage de divergence augmente sensiblement mais il tend à garder les mêmes proportions. Ce qui s'explique par le fait que les séquences protéiques sont 3x plus courtes que les séquences nucléotidiques en raison de la transcription des codons (ensemble de 3 nucléotides) codant pour un acide aminé. Un codon 'muté' sur le 3^{e} nucléotide a de grande chance de coder pour le même acide aminé (mutation 'silencieuse'). Cependant, lorsque la mutation intervient sur le 1er ou le 2^{e} nucléotide, il y aura un changement d'acide aminé, ce qui pourra entrainer un changement de conformation de la protéine finale et donc

impacter sur l'efficacité de sa fonction qui sera dans la grande majorité des cas, diminuée par rapport à la protéine initiale.

Dans le cas de ROP18, la protéine produite par PRU a un taux de divergence proche de 1,8% par rapport à celle exprimée dans RH, ce qui est déjà beaucoup pour des protéines qui doivent avoir la même fonction. Mais ce taux dépasse les 6,2% pour les souches VEG, FAM0001 et FAM0002. En plus des mutations ponctuelles, il y a également une insertion de 2 codons (en position 179 et 251), ce qui va ajouter 2 nouveaux acides aminés. La conformation de cette nouvelle protéine ROP18 n'aura certainement pas la même activité de la protéine native, ou ne sera pas exprimée de la même façon.

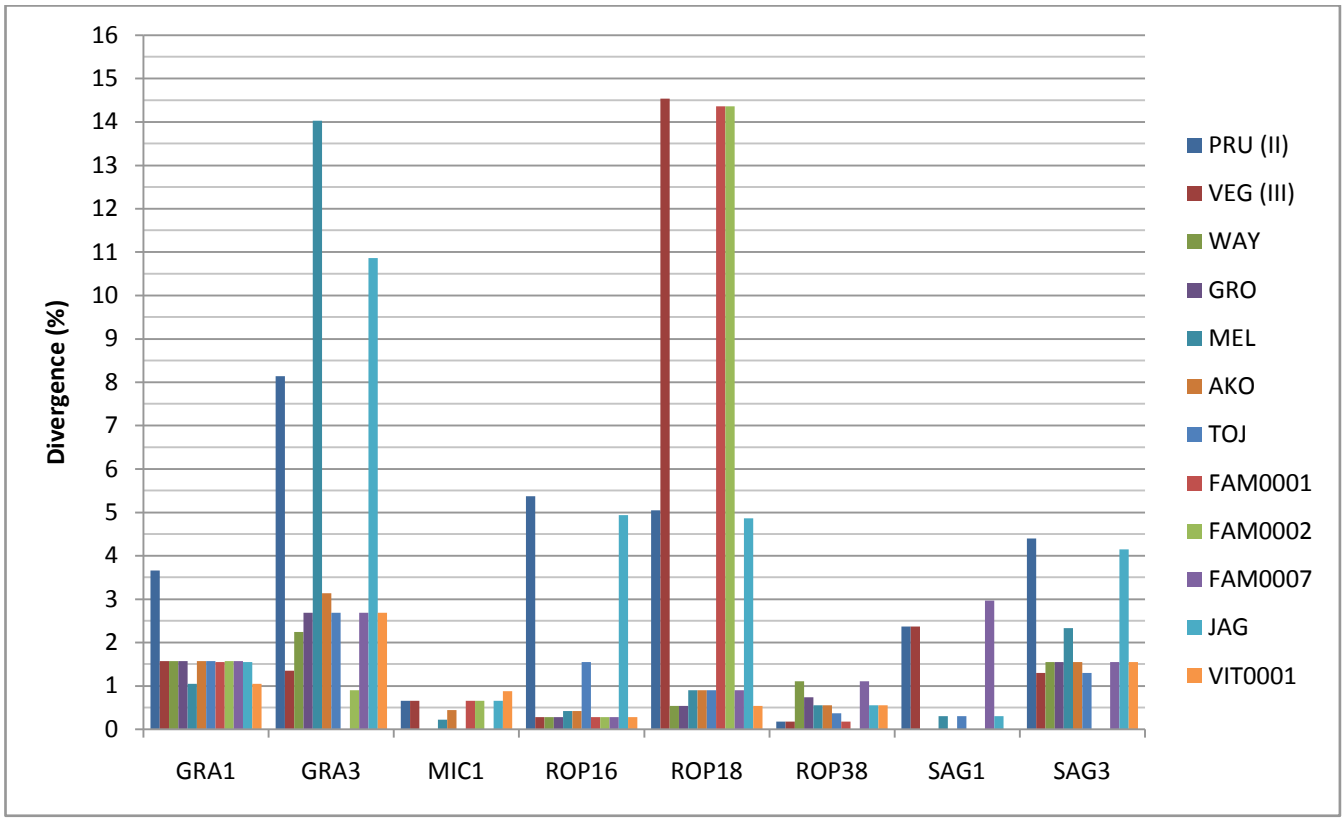


Figure 35 : Pourcentage de divergence en acides aminées par rapport à RH

II. 2. 2. 3. Arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique non enraciné a été construit à l'aide du logiciel Seaview et après concaténisation des 8 gènes pour chacune des souches (**Figure 36**).

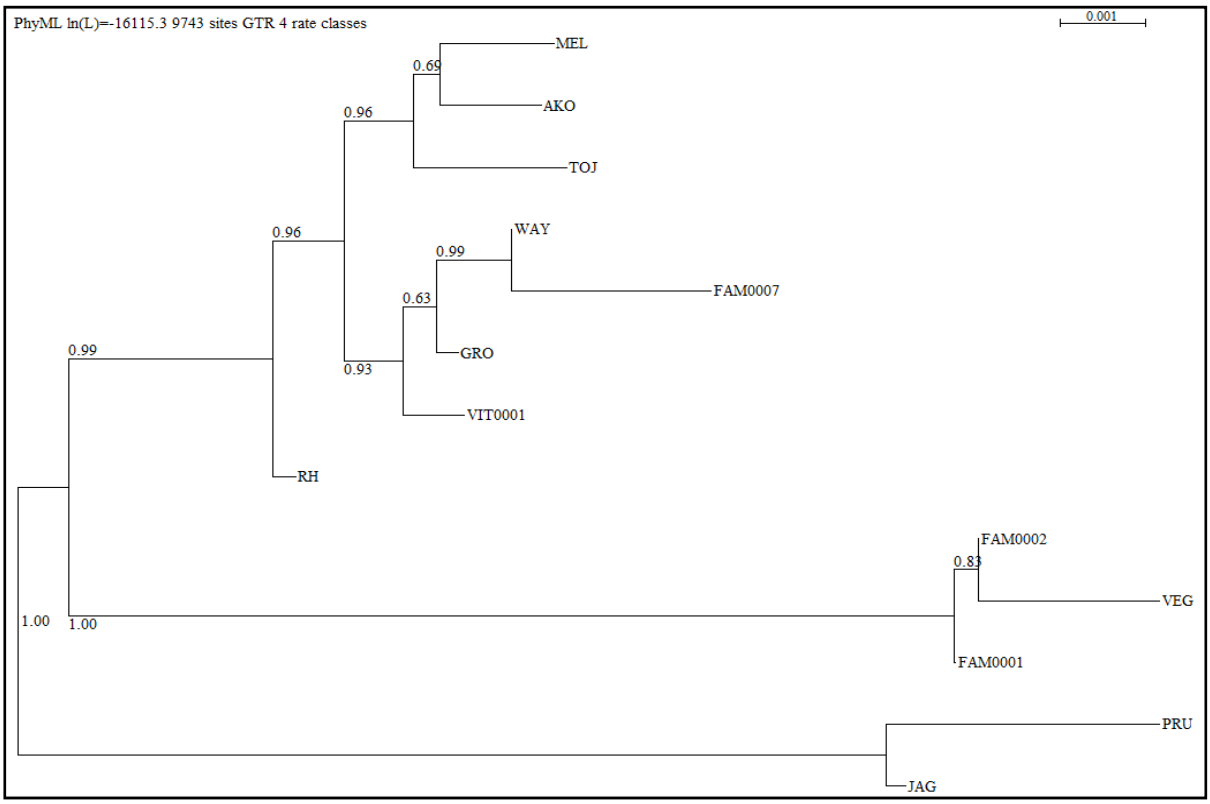


Figure 36 : Arbre phylogénétique à partir des 8 gènes de virulence.
Méthode de maximum de vraisemblance avec le modèle GTR sur les séquences des 8 gènes de virulences concaténés.

Bien que réalisé sur un petit nombre de souches, on constate dans un premier temps que les valeurs des 'bootstraps' sont très bonnes pour la plupart des branches. Cette valeur (variant de 0 à 1.0) indique le nombre de fois où cette branche a été retrouvée lors des répétions de l'analyse. Elle indique donc une évaluation de la résistance du nœud ce qui confirme la robustesse de l'arbre.

Ensuite, on retrouve 3 groupes distincts avec chacun une souche de référence.

- Le groupe avec la souche RH (type I) rassemble 7 souches sur les 10 souches étudiées. On retrouve la totalité des souches humaines (type Amazonien) et 2 souches animales : la souche domestique évoluant dans le biotope rural FAM0007 (type Amazonien) et la souche sauvage dans le biotope forestier VIT0001 (type Caribéen intermédiaire). La souche RH et les souches 'amazoniennes' auraient bien un ancêtre commun ce qui pourrait expliquer la

proximité en termes de comportement en virulence de ces souches chez les patients. Puis on a un autre ancêtre commun qui va faire la séparation entre 2 groupes : MEL, AKO, TOJ et WAY, GRO, FAM0007 et VIT0001.

- Le groupe avec la souche PRU (type II) ne comporte que la souche JAG (type Amazonien). Cette souche pourtant isolée d'un animal sauvage et génotypée 'amazonienne' a donc un ancêtre commun avec la souche PRU et pourrait donc avoir une virulence moindre que l'autre souche sauvage (VIT0001).
- Le groupe avec la souche VEG (type III) regroupe 2 souches génotypées 'Caribéenne 1 et 2' : FAM0001 et FAM0002. Ce sont 2 souches très proches génétiquement et évoluant dans la même zone géographique (**Figure 21**). On note cependant des différences au niveau des microsatellites (B17) ou de certains gènes (GRA3 ou ROP38). Ces 2 souches sont bien différentes mais ont un ancêtre commun très proche.

On peut encore accentuer la 'pertinence' de cet arbre en combinant les séquences des 8 gènes de virulence avec les séquences des microsatellites. L'augmentation de la taille de la séquence concaténée permet d'obtenir une robustesse plus élevée de l'arbre ainsi généré (**Annexe 8** : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences des gènes de virulence et des microsatellitesAnnexe).

II. 2. 2. 4. Expression de gènes

II. 2. 2. 4. 1. Analyse de l'ARN total

L'analyse de l'ARNt à l'aide du Bioanalyzer 2100 a permis de visualiser une caractéristique intéressante de T. gondii (en plus de vérifier l'intégrité de l'ARNt). Il possède un ribosome composé de 2 sous unités d'ARN ribosomal (ARNr) : 18S et 26S (contrairement à d'autres cellules eucaryotes qui ont une sous unité 28S). Cette différence sur la taille de la grosse sous unité d'ARNr est visible lors de l'analyse de l'ARNt. On peut ainsi suivre la multiplication de T. gondii (augmentation de la quantité de 26S) au détriment de la destruction des cellules eucaryotes (diminution de la 28S).

Le Bioanalyzer fait migrer chaque échantillon dans un capillaire différent puis reconstitue une image du 'gel' (**Figure 37**). L'analyse permet de déterminer l'intensité des bandes dans chaque puits pour le retranscrire sur un graphique (**Figure 38**).

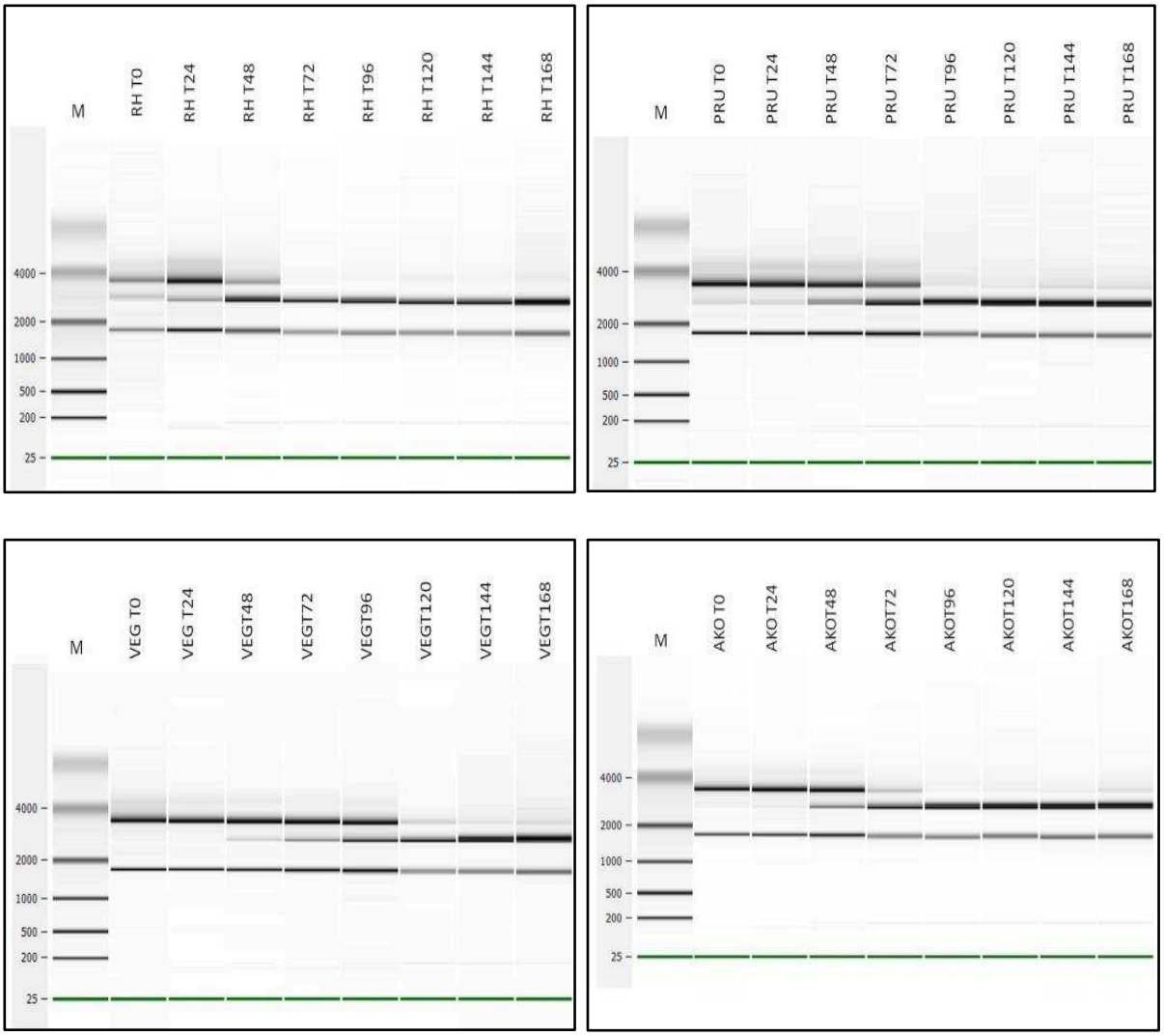


Figure 37 : Exemples d'images de 'gel' du Bioanalyzer

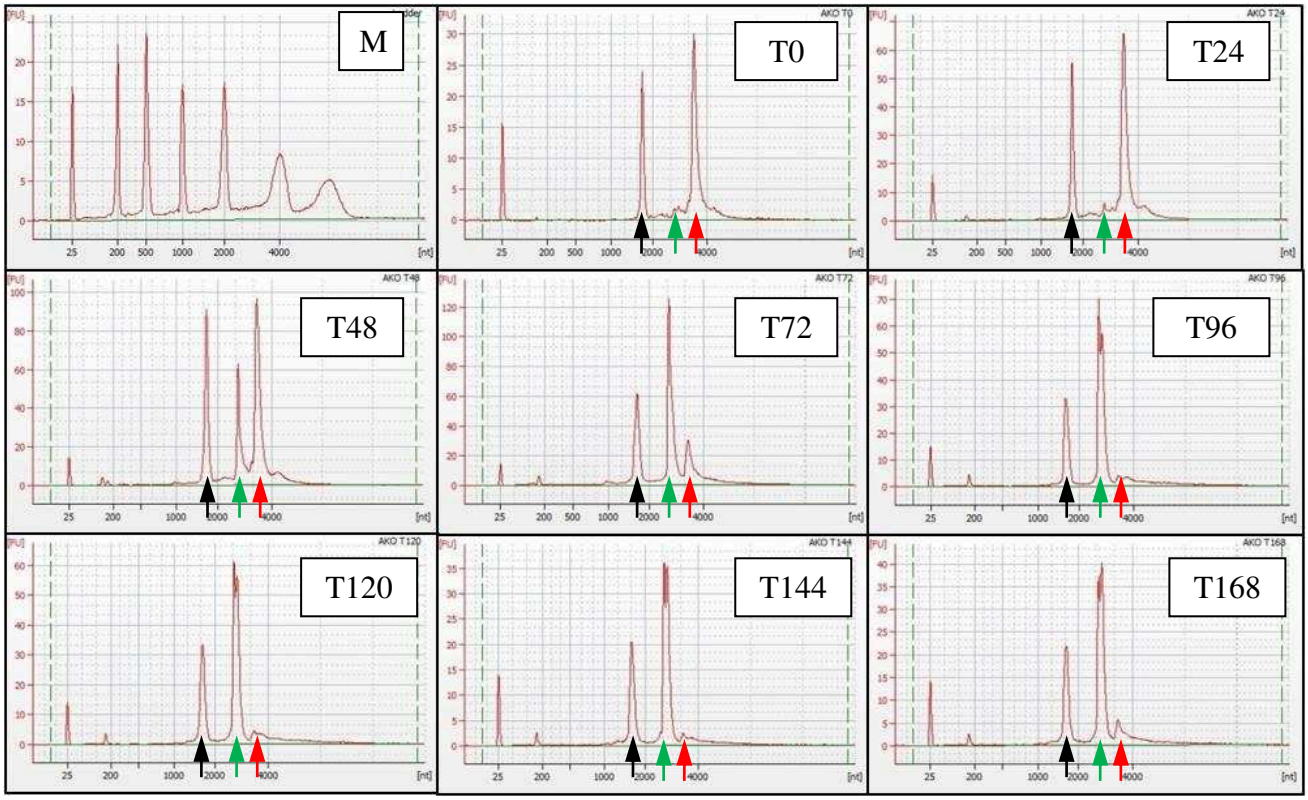
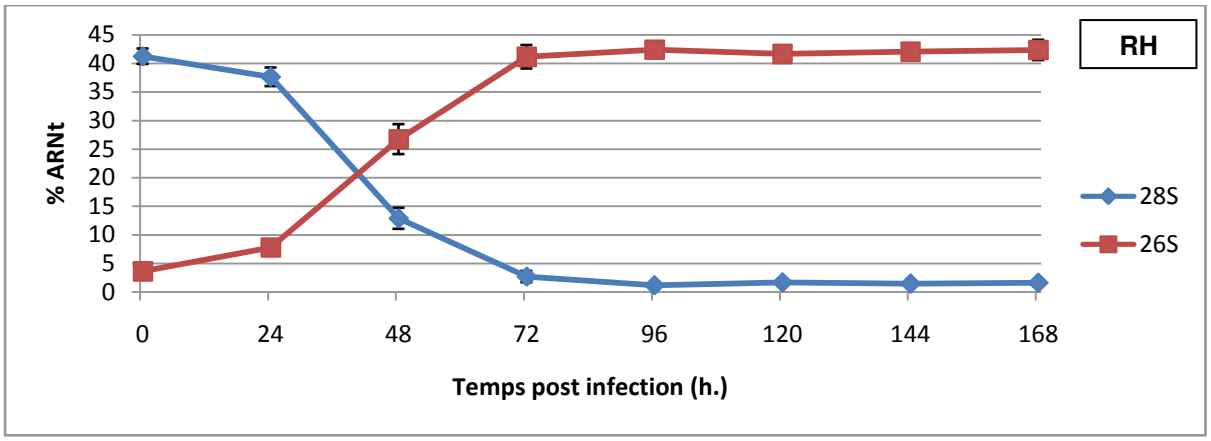
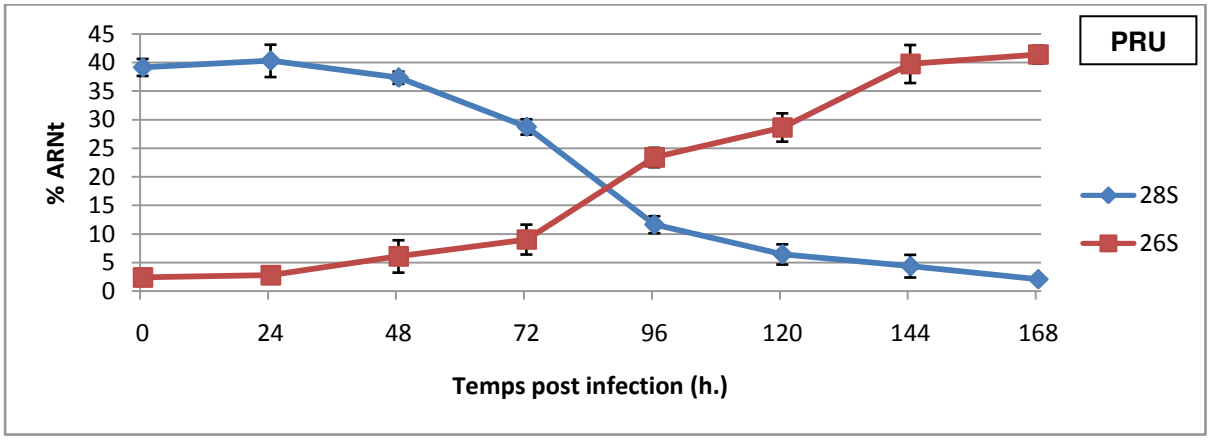


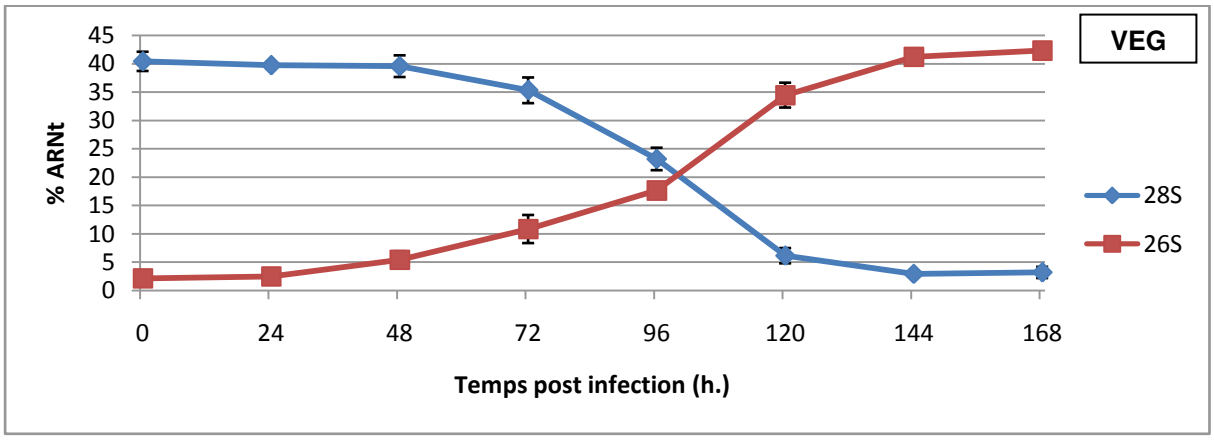
Figure 38 : Evolution de l'apparition de la sous unité 23S de l'ARNr de T. gondii (Souche AKO)
ARNt extrait à partir de culture de HFF-1 infectées par la souche AKO. Flèche noire : 18S, flèche verte : 26S, flèche rouge : 28S

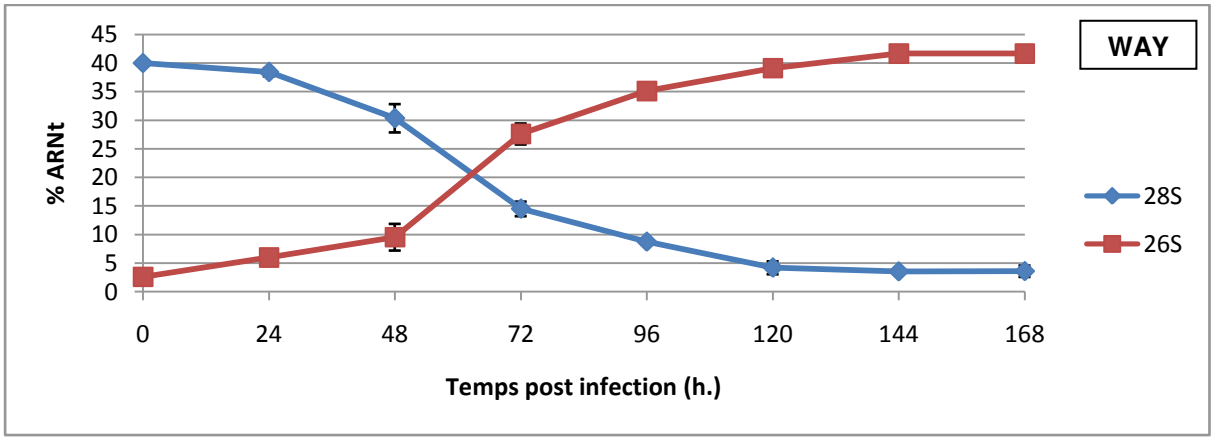
Le logiciel peut alors calculer plusieurs paramètres, dont 2 sont plus intéressants :

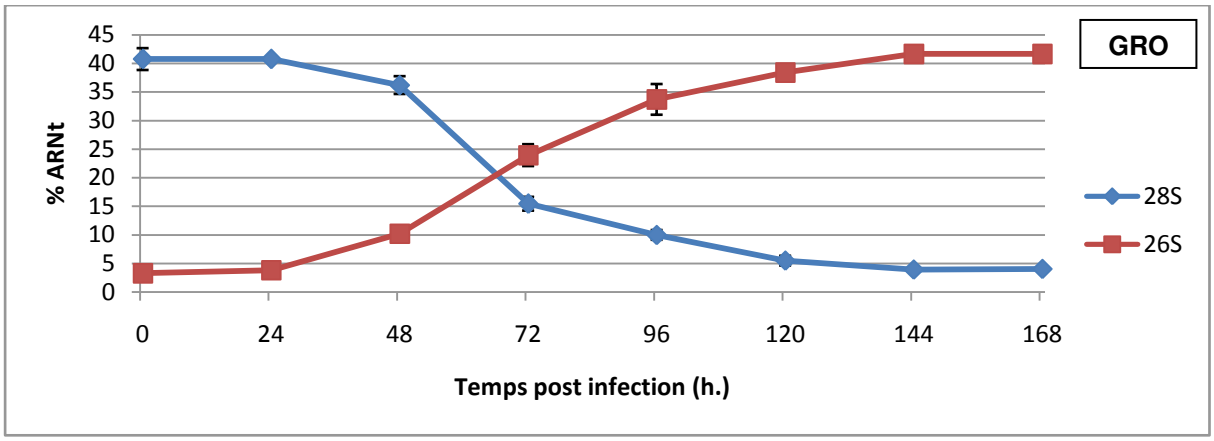
- Le RIN qui est une méthode pour déterminer la qualité de l'ARNt. Tous les ARNt extraits ont un RIN variant de 8,7 à 10, ce qui indique des ARNt de bonne qualité et non dégradés.
- Le pourcentage représente l'aire d'un pic par rapport à l'ensemble des pics détectés. Dans le cas de T. gondii, la présence d'un ARNr 26S est un indicateur très fort de la multiplication du parasite. Au contraire, la disparition de l'ARNr 28S (qui se dégrade très rapidement) indique la destruction des cellules lorsque les tachyzoïtes sortent (**Figure 39**).

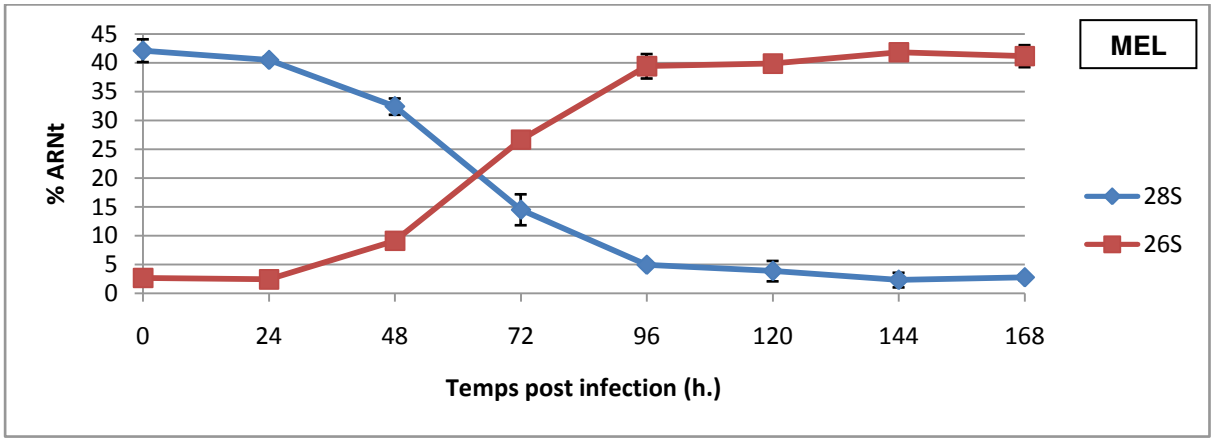

RH
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S

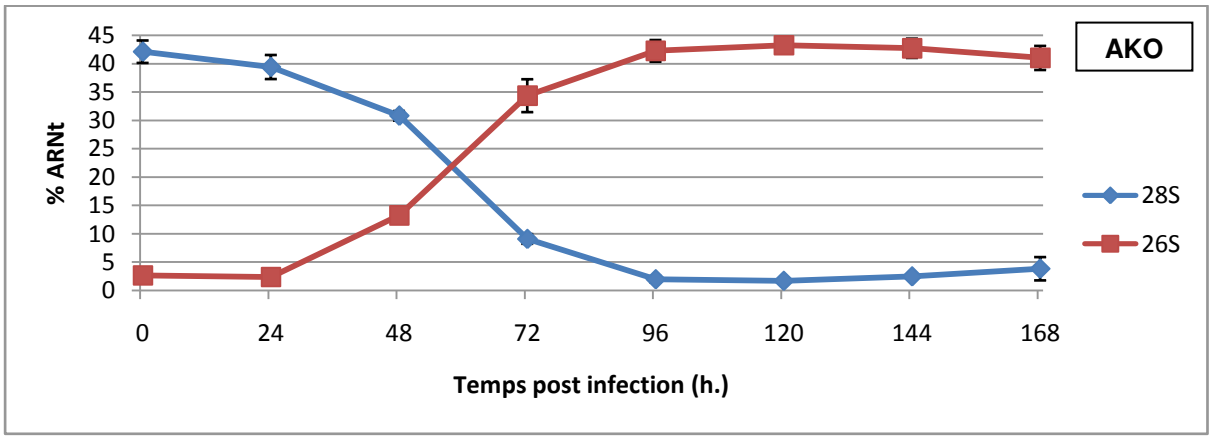

PRU
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S

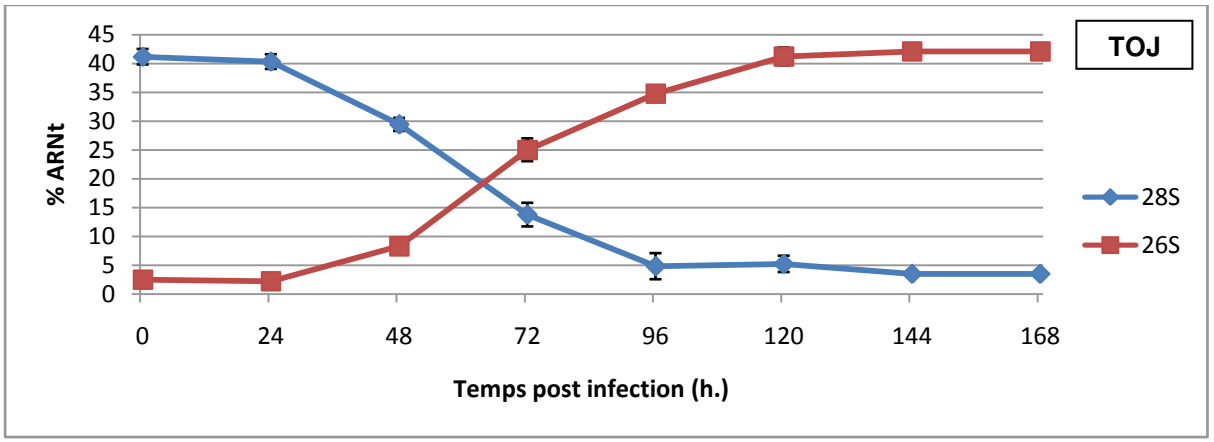

VEG
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S

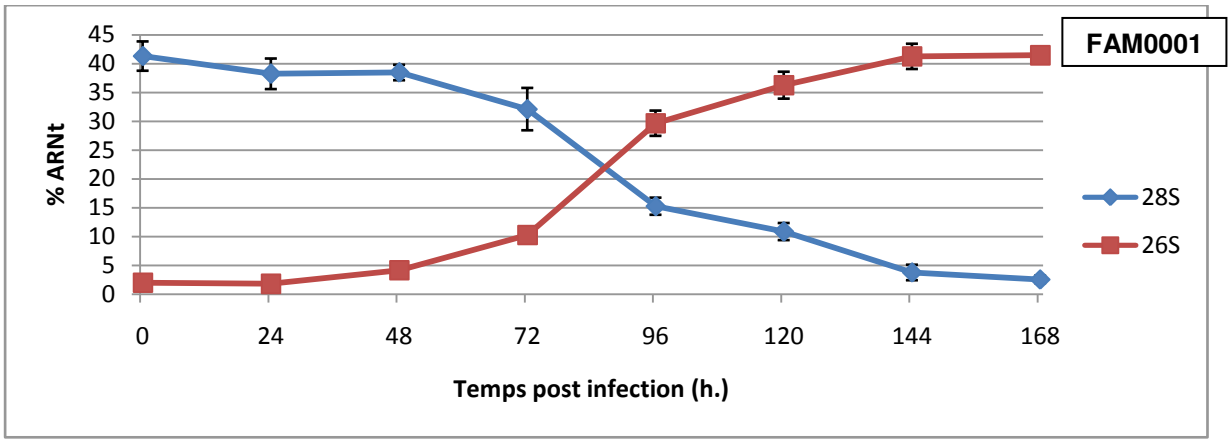

WAY
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S

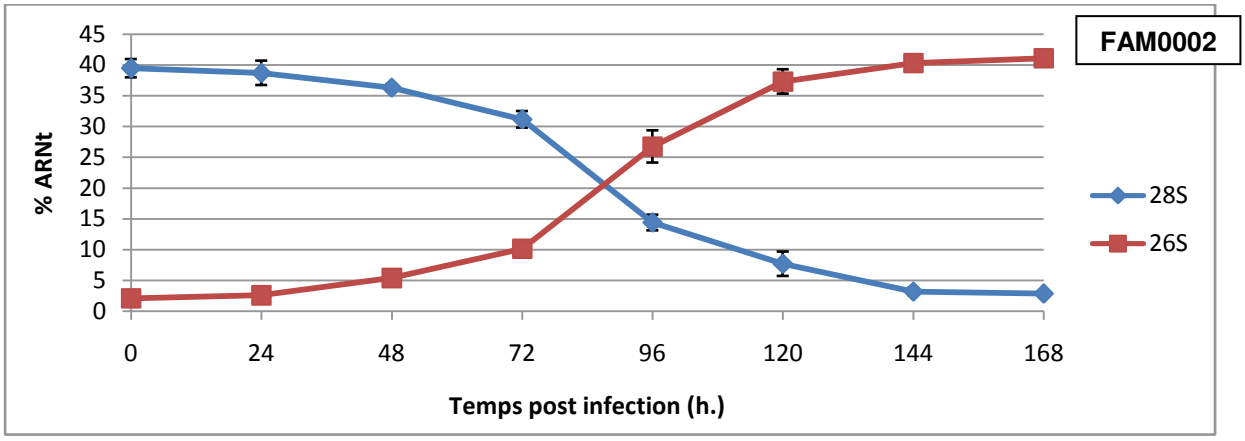

GRO
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S

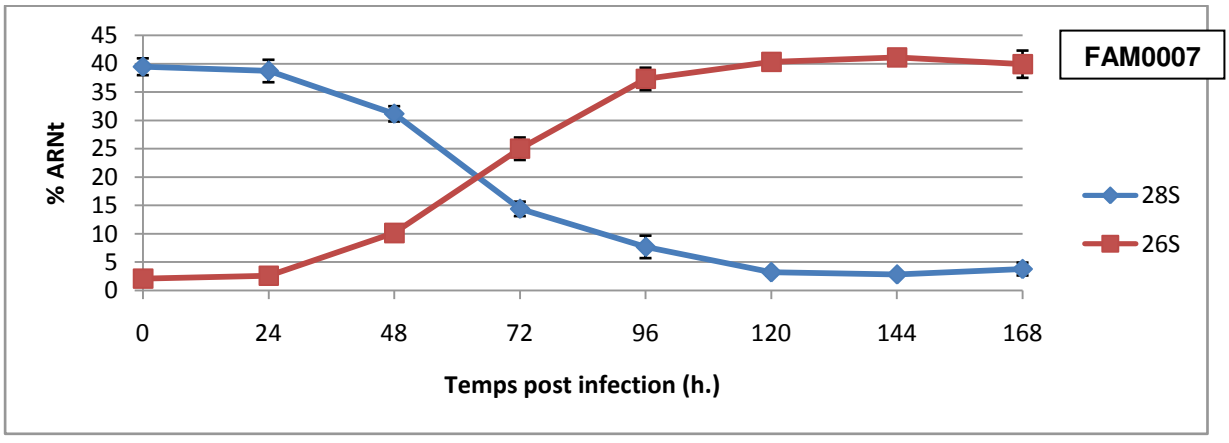

MEL
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S

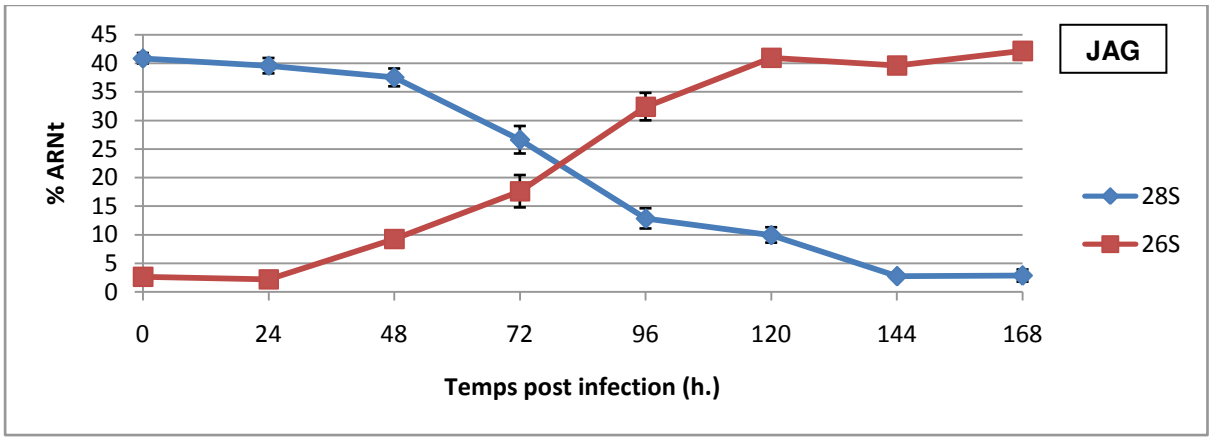

AKO
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S


TOJ
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S


FAM0001
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S


FAM0002
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S


FAM0007
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S


JAG
% ARNt
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps post infection (h.)
28S
26S

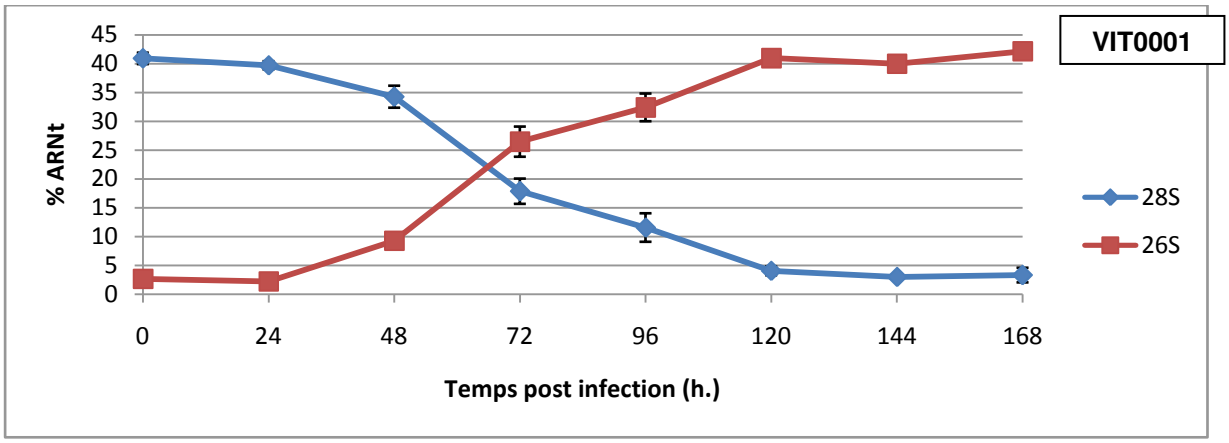


Figure 39 : Evolution des ARNr 26S et 28S après infection de HFF1

Si l'on compare, dans un 1er temps, les souches de référence, il y a une très nette différence entre la souche RH et les 2 autres souches (PRU et VEG). RH présente une multiplication très rapide puisque la lyse complète des cellules hôtes s'effectue en un peu plus de 72h. En ce qui concerne les 2 autres souches, la lyse complète des cellules hôtes est atteinte entre 144 et 168h. D'autre part, on constate que le moment où la proportion de 26S s'inverse par rapport au taux de 28S est très rapide pour RH (< 48h.), alors qu'il est plus lent chez PRU (< 96h.) et VEG (96h.). C'est un indicateur intéressant pour mesurer la vitesse de multiplication de T. gondii.

Les souches guyanaises ont, quant à elles, des profils différents. Les souches humaines atteignent rapidement le plateau (entre 96 et 120 h.). De plus, l'inversion de la proportion 26S – 28S est atteinte avant 72 h, ce qui montre une multiplication assez rapide de ces souches. Les souches animales ont plusieurs profils. Les souches FAM0007 et VIT0001 ont un comportement similaire aux souches humaines : atteinte rapide du plateau (< 72 h.) et inversion de la proportion 26S – 28S avant 72h. Les souches FAM0001, FAM0002 et JAG ont un comportement moins 'agressif'. Le plateau est atteint à 120 h. pour JAG et moins rapidement pour FAM0001 et FAM0002 (144 h.). Mais l'inversion de la proportion de 26S-28S n'intervient qu'après 72 h. La multiplication de ces 3 souches est donc moins rapide que les autres souches.

Si l'on compare ces résultats avec la construction de l'arbre phylogénétique en utilisant les 8 gènes de virulence (**Figure 36**), on retrouve ce 'groupage' de souches :

- Les souches humaines ainsi que les souches animales FAM0007 et VIT0001 ont un ancêtre commun avec la souche RH, impliquant ainsi la présence de

gènes à fort pouvoir pathogène ou de virulence. De plus, l'analyse des ARNr atteste également d'une capacité de multiplication plus importante.

- Les souches FAM0001, FAM0002 et JAG ont des ancêtres communs avec les souches de virulence moindre (PRU et VEG). Ces souches ont également une capacité de multiplication moins rapide que les souches proches de RH.

II. 2. 2. 4. 2. Quantification des gènes de virulence

Toutes les courbes standards ont été effectuées et l'efficacité (E) de chaque système étant comprise entre 0,87 et 0,98, les quantifications ont été réalisées.

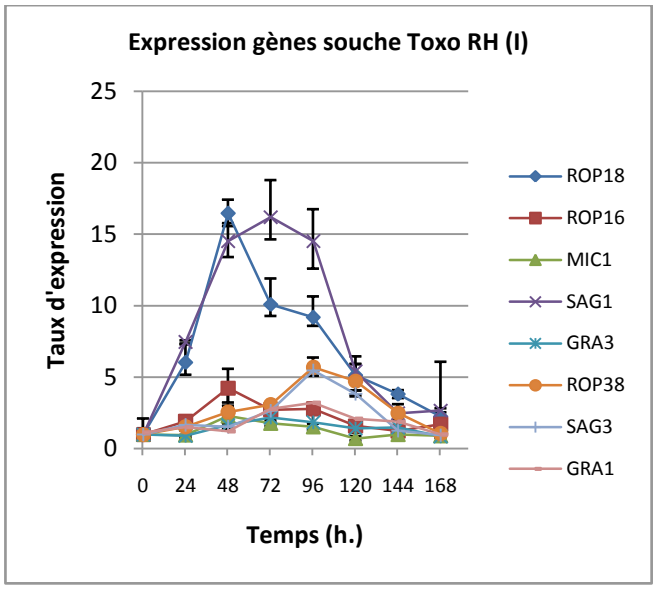
Comme on peut le voir sur les courbes de la **Figure 40**, toutes les souches n'expriment pas les gènes de la même façon. Plusieurs gènes ont une expression augmentée alors que d'autres ont une expression constante. D'autre part, on constate que parmi les gènes surexprimés, certains le sont plus précocement que d'autres.

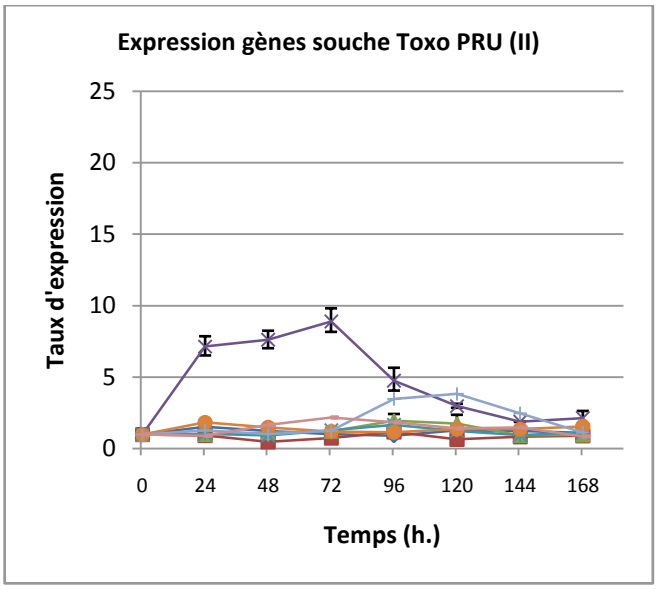
- En ce qui concerne ROP18, il y a une forte surexpression chez RH (>15). Il est cependant intéressant de constater qu'il n'y a pas de surexpression dans les souches PRU et VEG. L'expression des ARNm est constante pendant l'infection. Cette surexpression de ROP18 se retrouve également chez toutes les autres souches avec des intensités variables, allant de 5,8 chez JAG à 14,3 chez WAY. Le maximum d'intensité se situe vers à 72h. post infection sauf pour RH qui a un maximum d'intensité à 48h.
- On remarque aussi une expression précoce (à 72h. post infection) et importante de SAG1 pour toutes les souches avec des intensités variant de 20,4 chez AKO à 8,1 chez JAG.
- On retrouve également une surexpression plus modérée de SAG3 chez toutes les souches. Cependant, cette expression est plus tardive car le maximum d'intensité intervient vers 96h. post infection pour la plupart des souches et même 120h. chez PRU, FAM0001 et FAM0002.

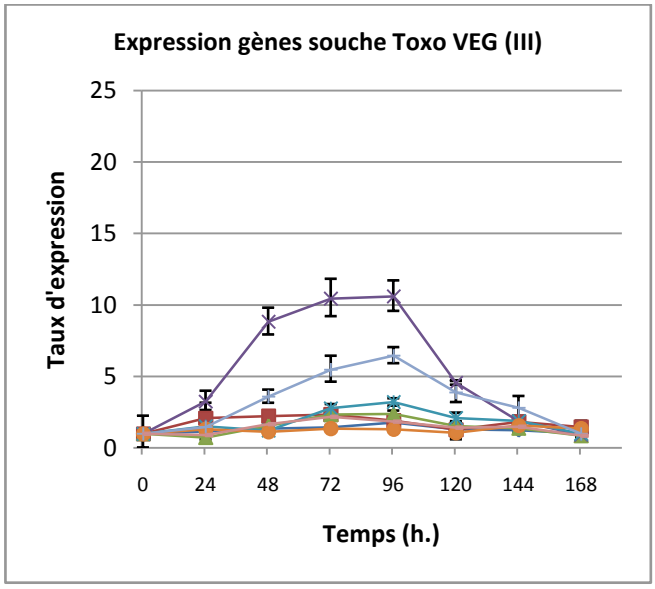
L'expression des autres gènes est plus modérée :

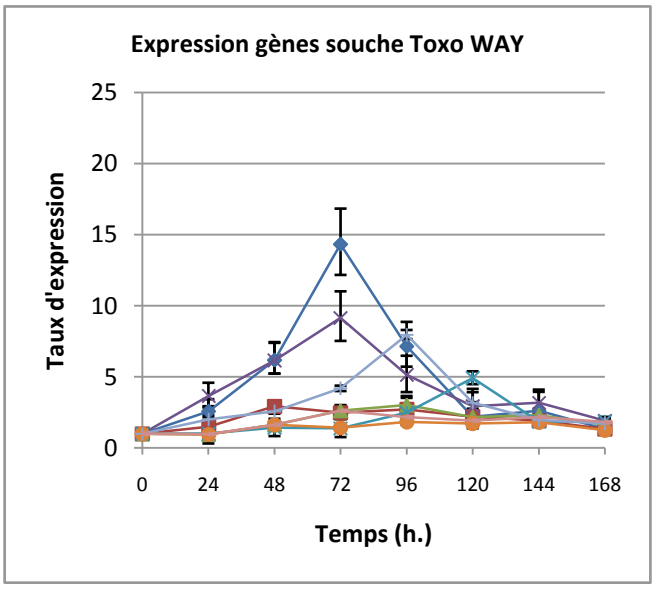
- Ainsi, pour le gène ROP38, une surexpression intervient chez RH et chez AKO à 96h. avec des taux respectifs de 5,7 et 3,1 ainsi que chez FAM0002 à 120h. avec un taux de 5,8.

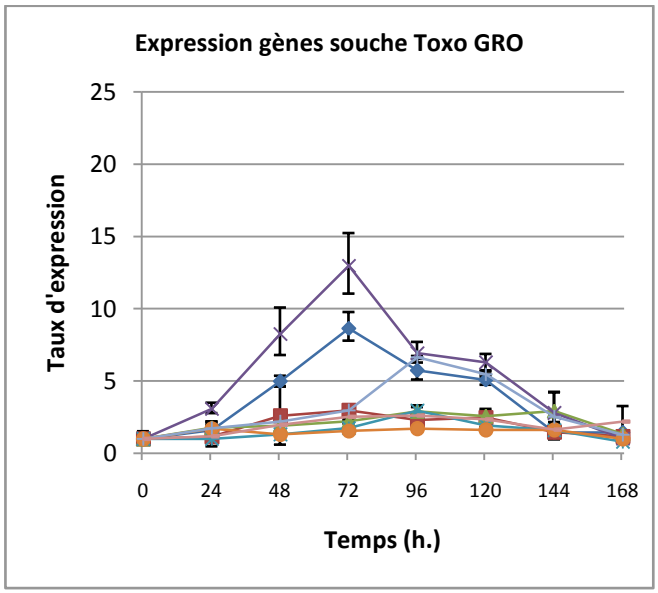
- On constate une surexpression de GRA3 chez WAY, MEL, AKO, FAM0001, FAM0002et FAM0007 tardivement (entre 96 et 120h.) avec des taux variant entre 4,9 (WAY) et 6,8 (MEL)
- Et MIC1 qui est un peu plus exprimé durant la phase médiane de l'infection (72 à 120h.) chez AKO, FAM0001, FAM0002 et FAM0007 avec des taux compris entre 4,3 (FAM0007) et 5,3 (FAM0001).

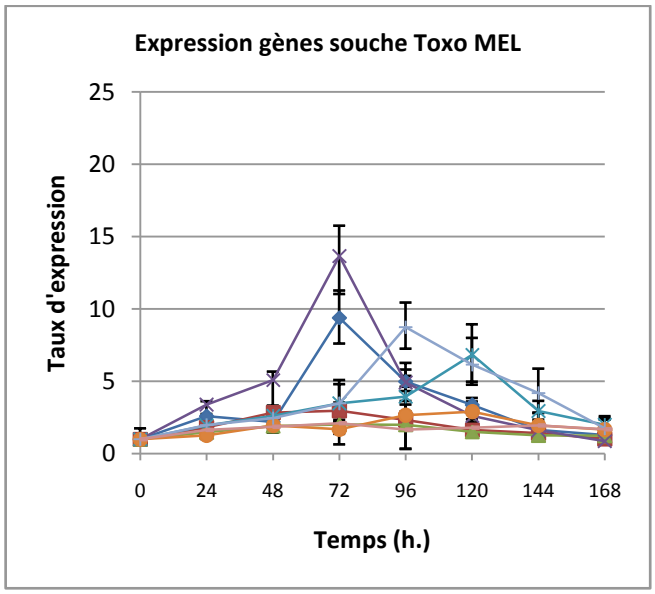

Expression gènes souche Toxo RH (I)
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0 24 48 72 96 120 144 168
Temps (h.)
ROP18
ROP16
MIC1
SAG1
GRA3
ROP38
SAG3
GRA1

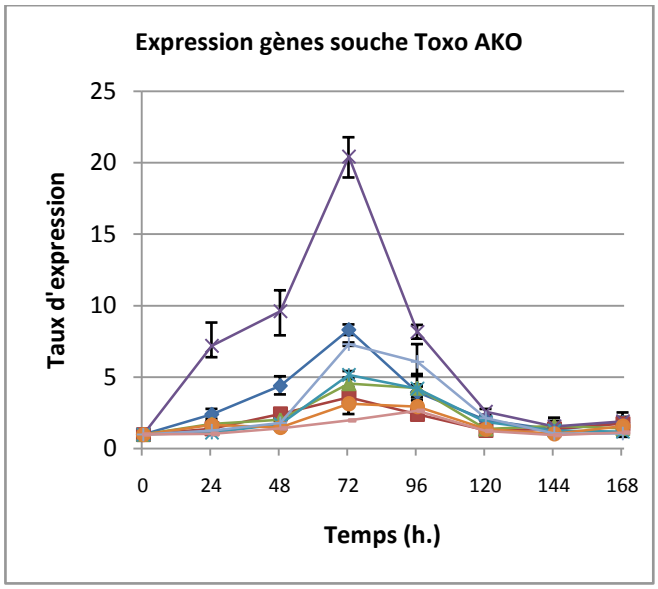

Expression gènes souche Toxo PRU (II)
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0 24 48 72 96 120 144 168
Temps (h.)

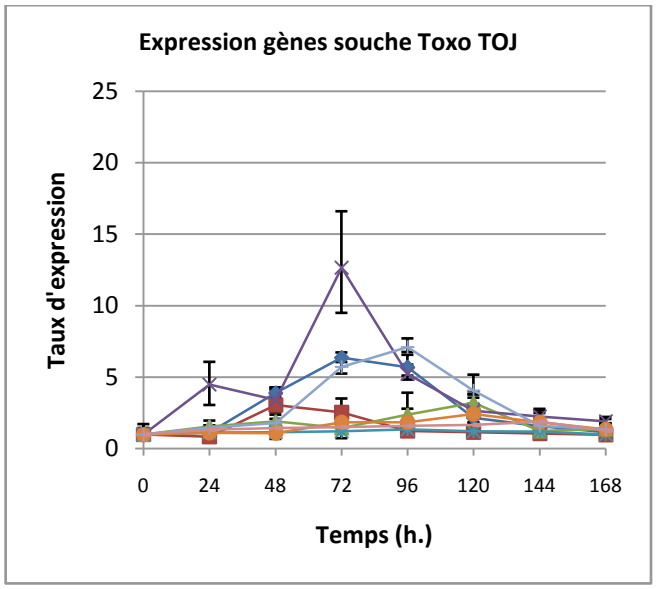

Expression gènes souche Toxo VEG (III)
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0 24 48 72 96 120 144 168
Temps (h.)

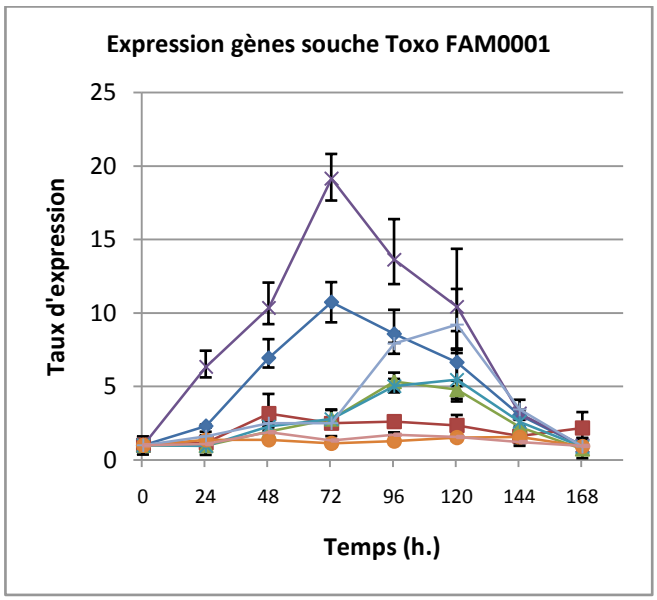

Expression gènes souche Toxo WAY
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0 24 48 72 96 120 144 168
Temps (h.)

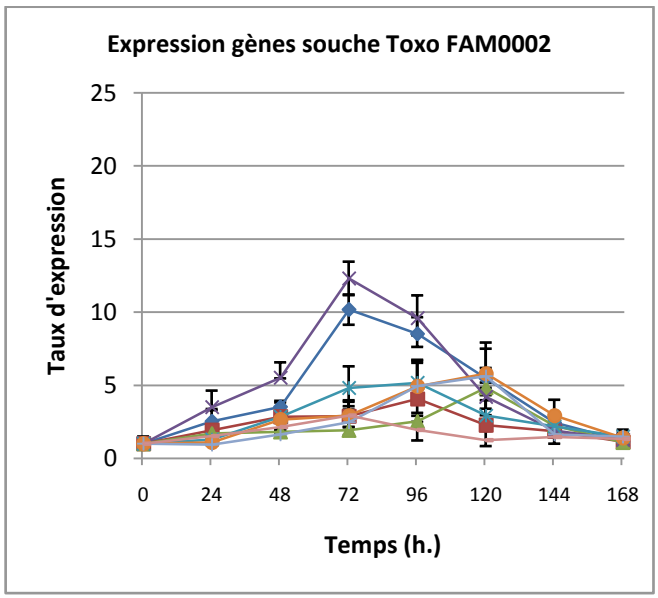

Expression gènes souche Toxo GRO
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0 24 48 72 96 120 144 168
Temps (h.)

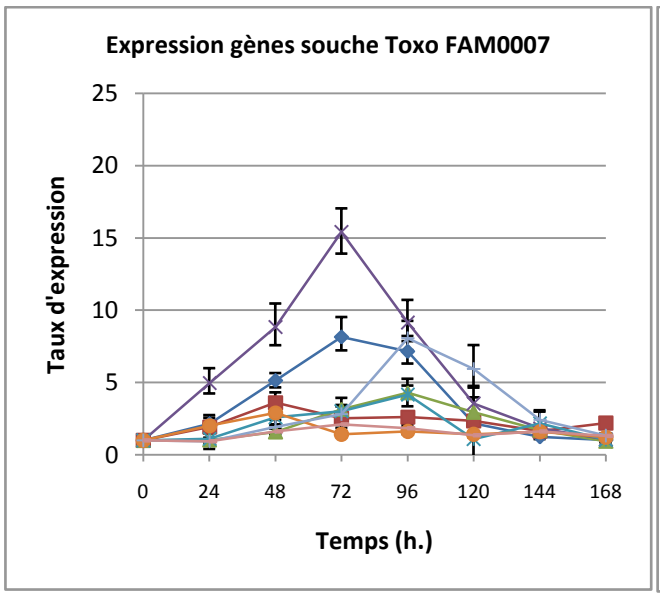

Expression gènes souche Toxo MEL
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0 24 48 72 96 120 144 168
Temps (h.)

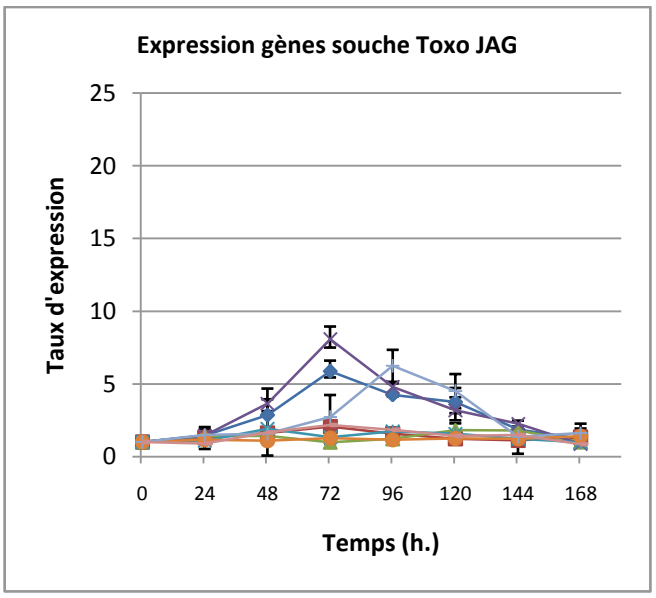

Expression gènes souche Toxo AKO
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps (h.)


Expression gènes souche Toxo TOJ
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps (h.)


Expression gènes souche Toxo FAM0001
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps (h.)


Expression gènes souche Toxo FAM0002
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps (h.)


Expression gènes souche Toxo FAM0007
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps (h.)


Expression gènes souche Toxo JAG
Taux d'expression
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
144
168
Temps (h.)

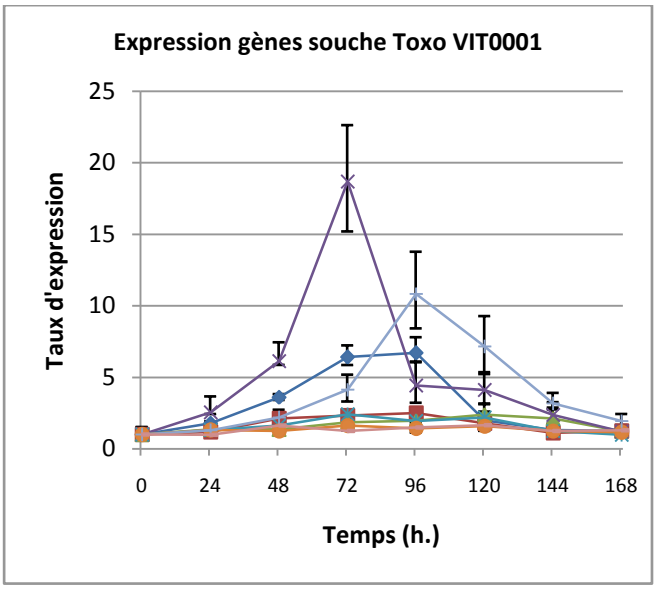


Figure 40 : Courbes d'expression de gènes
Expression de 8 gènes potentiellement impliqués dans la virulence de souches de T. gondii de 0 à 168h, post infection

II. 2. 2. 5. Analyse transcriptionnelle (Puces à ADN)

Le retour de la plate forme Génom'ic de Cochin s'est fait sous la forme d'un tableur après analyse supervisée. Ce tableur comporte 8893 lignes représentant la totalité des gènes de T. gondii ainsi que les SNP et les marqueurs (**Annexe 6**). Chaque gène est identifié par un numéro d'identification de la base ToxoDB (http://toxodb.org/toxo/), par une annotation sur la fonction (si elle est connue), sa position sur le génome, d'une description sur une analogie possible avec un gène provenant d'un autre organisme, de la séquence partielle du gène et de l'expression de ce gène par rapport à un référentiel. Cependant, le principal inconvénient de cette puce est que le génome de T. gondii n'est pas totalement annoté. Il existe encore de nombreuses parties codantes pour des protéines hypothétiques ou pour des protéines ayant une homologie avec des protéines issues d'autres organismes.

Dans notre étude, l'analyse a été faite en fonction de l'expression de RH (souche la plus virulente). Les taux d'expression sont donc exprimés par souche et par rapport à la souche RH. Afin de les comparer, ces taux ont ensuite été classés de l'expression la plus forte à la plus faible par rapport à la souche VEG. La souche VEG a une virulence faible chez la souris, contrairement à la souche RH. Une expression forte d'un gène chez RH et faible chez VEG pourrait indiquer un rôle potentiel de ce gène dans la virulence.

Un code couleur a été appliqué pour améliorer la lecture. Ainsi les taux d'expression de RH vs. une souche apparaitront en vert si l'expression est <-1 fois, en jaune si l'expression est entre -1 et 5 fois, en orange si l'expression est entre 5 et 30 fois et en rouge si l'expression est >40fois. De plus, certaines données ont volontairement été supprimées (annotation, séquence) afin de ne pas alourdir ces tableaux.

Le **Tableau 10** est le résultat des 10 premiers gènes dont l'expression de RH est la plus importante par rapport à VEG. On constate que dans la plupart des gènes, les valeurs sont supérieures (voire très supérieures) à 10. S'agissant d'une valeur 'RH vs. Souche, cela signifie que l'ARNm du gène en question est exprimé X fois plus que dans la souche. Si l'on prend la première ligne avec le gène 72.m00387, l'ARNm est exprimé 106 fois plus dans RH que dans VEG.

Il y a cependant 3 exceptions :

- Parmi ces 10 gènes, on retrouve le gène codant pour ROP18 (20.m03896) en 4^{e} position. RH a une expression très importante par rapport à VEG (75 fois)

mais aussi à FAM0001 et FAM0002, respectivement 180 et 169 fois. Par contre, l'expression de ROP18 est quasi identique entre RH et les autres souches : entre 2,99 fois pour JAG et -2.8 fois pour AKO (cela signifie qu'AKO a une expression supérieure à RH). ROP18 intervient lors de la pénétration du parasite et a un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte (**cf. I. 10. 3. 2**)

Nous relevons que les souches VEG, FAM0001 et FAM0002 ont un gène ROP18 qui est assez divergent par rapport aux autres souches : en position 180 et 251, il y a une insertion d'un codon supplémentaire ce qui se traduit par « l'apparition » de 2 nouveaux acides aminés dans la protéine (**Figure 33**). Le taux de divergence entre la protéine ROP18 de RH et ROP18 de ces 3 souches est proche de 14% (**Figure 35**). L'expression des ARNm de ROP18 par les souches VEG, FAM0001 et FAM0002 est donc très inférieure à celle des autres souches. . De plus, du fait des insertions dans certains gènes, la protéine traduite, sa structure tertiaire et sa fonction peuvent être altérées. On constate toutefois que cela n'entraine pas une baisse significative de la virulence de FAM0001 et FAM0002 au niveau souris (**Figure 24**, **Figure 28**).

- Le gène 55.08219 qui code pour la protéine ROP16, a un taux d'expression 7.22 fois plus élevé chez RH que chez VEG, tandis qu'il est compris entre 3,86 chez VIT0001 et -1.77 chez WAY. ROP16 est une protéine inhibant la réponse immunitaire de l'hôte (**cf. I. 10. 3. 2**)
- Le gène 79.m0015 est un candidat intéressant. Son expression dans RH est 50 fois plus importante que dans VEG. Par contre, son expression est comprise entre -1,23 (souche FAM0002) et 15,63 (souche JAG). Malheureusement, le génome n'est pas encore suffisamment annoté. Il s'agit d'une protéine 'hypothétique' : il y a un codon d'initialisation et un codon STOP avec une phase codante. L'analyse dans les bases de données n'a pas permis d'identifier une protéine proche même dans une autre espèce. Nous pouvons simplement dire que l'expression des ARNm est très faible dans la souche VEG par rapport à l'expression de RH. La protéine correspondante sera donc sous représentée dans VEG.

Le tableau suivant (**Tableau 11**) nous donne les résultats de l'analyse des puces à ADN sur les 8 gènes de virulence qui ont été décrits dans la partie précédente. Parmi les gènes qui ont un taux d'expression élevé dans RH par rapport à VEG, on retrouve le gène ROP18 (cf. ci-dessus) mais également le gène ROP16 (55.m08219). Son taux par rapport à VEG est 7,2 fois plus élevé que chez VEG. Les rapports sont plus faibles pour les autres souches (de 3,66 chez VIT0001 à -1,77 chez WAY). Ces 2 protéines ROP interviennent, de façon différente, dans la diminution de la réponse immunitaire de l'hôte (**cf. I. 10. 3. 2**), ce qui va favoriser la multiplication du parasite.

Avec des taux plus modérés, les gènes SAG1 et SAG 3 présentent une augmentation d'expression dans RH par rapport à VEG (respectivement de 5,45 et de 5,24), alors que les taux d'expression par rapport aux autres souches sont moins importants. Pour SAG 1, les rapports vont de 3,53 pour PRU à 1,01 pour AKO et vont de 3,00 pour PRU à -2,59 pour AKO en ce qui concerne SAG 3.

Pour le gène MIC 1 qui intervient dans la fixation et la pénétration du parasite dans les cellules hôtes, le taux d'expression de RH est 4,77 fois plus élevé que dans VEG. L'expression dans les autres souches varie de 2,68 pour VIT0001 à -2,46 pour AKO.

Le dernier tableau (**Tableau 12**) est une liste (non exhaustive) de 28 gènes ayant une expression diminuée dans VEG par rapport à RH mais avec une expression plus modérée dans les autres souches. Outre les protéines non identifiées, on retrouve plusieurs gènes intéressants comme :

- la nucléoside-triphosphatase (NTPase) I (65.m00001) et II (65.m01111) sont des protéines isoformes de 63 kDa avec une différence de 16 acides aminés. La fonction de ces NTPase est d'hydrolyser les nucléotides préférentiellement tri-phosphate pour le type I et di- et tri-phosphate pour le type II. De plus, la NTPase I clive l'ATP 4,5 fois plus vite que la NTPase II. Toutefois, leur rôle biologique n'est pas encore connu (Asai et al. 1995). Leur présence est cependant nécessaire pour la croissance et la virulence des souches de T. gondii pendant l'invasion des cellules hôtes (Olias and Sibley 2016).
- la cyclophiline (44.m01269) est une protéine de 18kDa qui intervient dans le recrutement des macrophages sur le site de l'infection. La cyclophiline est libérée par les tachyzoïtes et se lie au récepteur transmembranaire CCR5 exprimé par certaines cellules déclenchant la production d'IL-12 (Ibrahim et al.

2014). Cette production d'IL-12 est complémentaire de la voie d'activation d'IL-12 via les TLR11 et l'activation de MyD88 (cf. I. 9. 1). Cette production d'IL-12 n'a pas pour but de détruire le parasite mais améliore la prolifération des macrophages et des lymphocytes et permet aux parasites d'utiliser leurs propriétés migratoires (Ibrahim et al. 2010).

- ROP5 (551.m00238) est une pseudokinase qui joue un rôle dans la virulence en bloquant la production d'INF-g dans les macrophages activés. ROP5 peut aussi formée un complexe avec ROP18 afin d'augmenter l'activité kinase de ROP18 (Behnke et al. 2012). Son taux d'expression est 9,32 fois plus élevé chez RH que chez VEG. Pour les autres souches, le taux varie de 7,93 chez JAG à 1,24 chez AKO.
- GRA7 (20.m00005) intervient dans la réponse immunitaire des macrophages de l'hôte car il interagit avec le facteur 6 associé au récepteur TNF (TRAF6) via le gène MyD88 (Koh et al. 2017). Il intervient également sur le complexe ROP5/ROP18 afin de réduire l'impact des GTPases liées à l'immunité (Zhang et al. 2016) empêchant ainsi la destruction de la membrane de la vacuole parasitophore. RH l'exprime 6,96 fois plus que chez VEG. Il varie de 2,63 chez PRU à -1,7 chez AKO.
- Le gène 42.m03509 code pour une protéine kinase comportant un domaine calmoduline qui est une protéine capable de s'associée à des ions Ca^{2+} présents dans le milieu cellulaire. Le calcium est impliqué dans un grand nombre de voies métaboliques essentielles liées à la sécrétion de protéines, à l'activation de la mobilité, à l'invasion ainsi qu'à l'évasion des cellules hôte (Nagamune et al. 2008). Le domaine calmoduline comporte 4 copies d'un motif structurel appelé 'main EF' qui consiste en une hélice (E) et une boucle (F) de 12 acides aminés qui fixe les ions calcium. C'est cette fixation du calcium qui active la fonction kinase (Long et al. 2017). Le taux d'expression chez RH est 5,69 fois plus important que chez VEG. Pour les autres souches, ce taux varie de 2,66 chez FAM0007 à -7,46 chez WAY.

Tous ces gènes ont potentiellement un rôle à jouer dans la virulence d'une souche soit en empêchant la mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte, soit en limitant la destruction de la vacuole parasitophore, soit en augmentant leur vitesse de réplication. Très

probablement que la combinaison de l'ensemble de ces gènes ainsi que de leur taux d'expression sera impliquée dans le niveau de virulence d'une souche par rapport à une autre.

Tableau 10 : Analyse transitionnelle de 10 gènes
les plus fortement exprimés chez RH par rapport à VEG et en comparaison des autres souches.

p-value (RH vs, VIT01)	3,41E-23	8,93E-23	9,12E-18	2,46E-07	3,78E-13	1,18E-18	2,65E-17	4,29E-20	8,67E-15	6,03E-22
Fold-Change (RH vs, VIT01)	114,499	104,702	54,0088	2,32785	3,40306	42,7068	40,1912	43,2277	32,8222	33,1353
p-value (RH vs, JAG)	1,51E-23	4,66E-22	2,26E-18	2,71E-09	7,69E-21	4,09E-18	2,93E-17	1,27E-20	2,13E-15	1,06E-22
Fold-Change (RH vs, JAG)	136,25	75,5024	69,9795	2,99102	15,6389	34,8391	39,534	53,2912	41,5369	43,8232
p-value (RH vs, FAM07)	9,60E-19	1,42E-21	8,83E-10	4,91E-06	4,34E-14	1,15E-10	4,57E-15	4,55E-15	1,26E-15	6,97E-20
Fold-Change (RH vs, FAM07)	20,2675	61,3297	5,21881	2,00222	3,88595	4,84311	18,4889	9,30036	45,5216	17,0411
p-value (RH vs, FAM02)	8,30E-24	2,27E-19	2,43E-18	1,18E-23	0,03031	1,03E-19	5,89E-15	1,96E-18	6,59E-15	8,24E-20
Fold-Change (RH vs, FAM02)	155,246	26,7126	69,0011	169,373	-1,21296	65,9043	17,8671	23,9278	34,3286	16,6836
p-value (RH vs, FAM01)	9,15E-24	8,28E-21	4,40E-17	8,84E-24	0,05474	4,26E-16	8,40E-13	4,18E-21	8,93E-16	5,62E-18
Fold-Change (RH vs, FAM01)	151,902	45,0153	41,0428	180,978	1,18443	17,7361	9,77597	65,1506	48,352	10,2715
p-value (RH vs, TOJ)	3,51E-23	1,76E-21	8,03E-18	1,60E-07	7,81E-14	2,93E-18	1,45E-16	3,34E-15	3,63E-15	1,16E-21
Fold-Change (RH vs, TOJ)	113,821	59,0169	55,2581	2,38083	3,74413	36,7565	30,5294	9,60538	37,9082	30,0038
p-value (RH vs, AKO)	2,68E-17	2,14E-20	1,34E-17	2,26E-06	0,02035	2,25E-19	7,26E-15	8,70E-10	5,51E-16	1,11E-18
Fold-Change (RH vs, AKO)	13,3235	38,4563	50,4425	-2,07993	1,23172	57,0537	17,3776	3,41454	52,7564	12,2498
p-value (RH vs, MEL)	1,87E-23	4,66E-22	3,18E-17	1,20E-06	7,24E-18	1,14E-13	1,02E-15	3,08E-20	3,73E-15	4,32E-22
Fold-Change (RH vs, MEL)	130,09	75,4936	43,3763	2,14662	7,57388	9,17674	22,7886	45,7065	37,7397	34,9045
p-value (RH vs, GRO)	2,65E-21	2,29E-21	2,97E-16	0,00012	0,00411	1,01E-19	1,71E-14	0,16948	6,88E-16	1,00E-20
Fold-Change (RH vs, GRO)	49,986	56,2784	30,1172	-1,71634	1,30532	66,0774	15,5374	-1,1917	50,6776	21,9911
p-value (RH vs, WAY)	2,65E-16	8,12E-20	6,83E-19	0,2762	2,06E-13	2,63E-19	1,37E-14	7,12E-06	1,71E-16	5,61E-14
Fold-Change (RH vs, WAY)	10,3129	31,1683	88,4216	-1,13974	3,52762	55,4819	15,9932	2,04018	65,6518	4,59633
p-value (RH vs, PRU)	8,30E-22	4,19E-21	1,05E-16	7,50E-08	1,81E-16	5,87E-18	1,70E-16	3,51E-18	3,68E-14	9,05E-21
Fold-Change (RH vs, PRU)	91,0205	73,5488	49,9868	2,70325	6,79856	45,9182	41,1732	29,6096	35,6614	30,0035
p-value (RH vs, VEG)	3,75E-22	1,59E-21	7,38E-18	4,47E-21	1,87E-23	7,07E-18	1,24E-16	8,15E-19	4,55E-14	4,03E-21
Fold-Change (RH vs, VEG)	106,948	88,7814	82,421	75,6624	50,8759	44,4788	43,4639	37,2521	34,419	33,9723
Map (chromosome: position)	8:314432..318271	13:2973920..2976955	5:655803..656642	8:1480543..1482207	15:1186980..1188824	2:907114..907686	13:5954276..5960993	11:6063774..6108857	11:3317841..3321082	7:3114286..3114789
Annotation	sulfate transporter, putative	hypothetical protein	hypothetical protein	rhoptry protein (ROP18), putative / protein kinase domain-containing protein	hypothetical protein	SAG2 related antigen SAG2B	ankyrin repeat-containing protein	dynein gamma chain, putative	white protein, putative	hypothetical protein
ToxoDB	72.m00387	583.m00665	641.m01540	20.m03896	79.m00015	25.m00004	35.m00027	541.m01230	80.m02212	49.m03400

Tableau 11 : Analyse transcriptionnelle des 8 gènes de virulence
Taux exprimé chez RH par rapport à VEG et en comparaison des autres souches.

p-value (RH vs. VIT01)	1,49E-13	2,17E-15	2,89E-13	2,46E-07	6,36E-15	2,79E-13	6,65E-15	9,80E-10
Fold-Change (RH vs. VIT01)	2,76833	3,25694	2,68794	2,32785	3,86094	6,23677	3,5063	2,11316
p-value (RH vs. JAG)	8,76E-13	2,14E-22	2,27E-11	2,71E-09	7,96E-09	9,01E-14	6,40E-14	2,16E-10
Fold-Change (RH vs. JAG)	2,54833	11,4434	2,22319	2,99102	1,95406	6,89959	3,09024	2,24804
p-value (RH vs. FAM07)	4,76E-10	1,17E-11	2,38E-11	4,91E-06	4,26E-13	4,09E-08	1,21E-10	3,36E-07
Fold-Change (RH vs. FAM07)	1,97783	2,18983	2,21899	2,00222	3,02736	2,68626	2,18039	1,70881
p-value (RH vs. FAM02)	2,32E-07	4,08E-08	1,93E-07	1,18E-23	3,99E-07	1,50E-07	9,75E-11	7,89E-08
Fold-Change (RH vs. FAM02)	1,61778	1,6613	1,6283	169,373	1,7022	2,49676	2,19921	1,79529
p-value (RH vs. FAM01)	0,04292	0,124374	7,79E-06	8,84E-24	0,970261	0,004676	0,01331	0,000107
Fold-Change (RH vs. FAM01)	1,15321	1,10618	-1,46513	180,978	1,00287	1,47085	1,20911	-1,4245
p-value (RH vs. TOJ)	1,80E-12	2,47E-14	9,33E-12	1,60E-07	1,14E-12	0,001395	2,36E-14	2,73E-09
Fold-Change (RH vs. TOJ)	2,46813	2,8702	2,305	2,38083	2,87598	1,5643	3,26244	2,03012
p-value (RH vs. AKO)	0,108768	0,021276	5,54E-11	2,26E-06	0,002957	4,86E-12	0,873461	8,31E-12
Fold-Change (RH vs. AKO)	1,11738	-1,16928	-2,14622	-2,07993	-1,2877	4,92122	1,01147	-2,59907
p-value (RH vs. MEL)	5,98E-11	1,54E-11	2,17E-11	1,20E-06	1,96E-08	1,95E-09	4,12E-12	2,83E-05
Fold-Change (RH vs. MEL)	2,1364	2,16638	2,2272	2,14662	1,8903	3,22761	2,51795	1,48354
p-value (RH vs. GRO)	0,004765	0,509571	0,031691	0,000124	0,001831	8,12E-05	0,214752	0,002089
Fold-Change (RH vs. GRO)	1,23099	1,0433	-1,16473	-1,71634	-1,3072	1,80113	1,09453	-1,30064
p-value (RH vs. WAY)	0,032091	0,171127	8,68E-11	0,276195	1,16E-07	0,001919	4,40E-05	3,23E-11
Fold-Change (RH vs. WAY)	1,16389	-1,0935	-2,1095	-1,13974	-1,77524	-1,53941	1,42716	-2,44154
p-value (RH vs. PRU)	4,77E-13	9,06E-17	3,69E-12	7,50E-08	5,95E-12	5,67E-05	4,15E-14	2,90E-12
Fold-Change (RH vs. PRU)	2,87249	4,46559	2,60539	2,70325	2,90795	1,94264	3,53044	3,00983
p-value (RH vs. VEG)	8,85E-16	3,45E-17	1,20E-15	4,47E-21	1,13E-17	0,167058	6,79E-17	5,07E-16
Fold-Change (RH vs. VEG)	4,1263	4,77549	4,05767	75,6624	7,22449	-1,21233	5,45565	5,24586
Map (chromosome: position)	10:5305298..5306005	12:993038..993700	11:4485068..4487411	8:1480543..1482207	9:1045896..1048019	7:1881677..1883302	10:2662614..2663624	14:472977..474134
Annotation	dense granule protein 1 / major antigenp24 (GRA1)	dense granule protein 3 (GRA3)	Microneme protein 1 (MIC1)	Rhoptry protein, putative / protein kinase domain-containing protein (ROP18)	Rhoptry protein, putative / protein kinase domain-containing protein (ROP16)	protein kinase domain-containing protein (ROP38)	major surface antigen p30 (SAG1)	surface antigen (SAG3)
ToxoDB	59.m00089	42.m00013	80.m00012	20.m03896	55.m08219	49.m03275	44.m00009	551.m00001

Tableau 12 : Analyse transcriptionnelle de gènes 'candidats'
Taux exprimé chez RH par rapport à VEG et en comparaison des autres souches.

p-value (RH vs, VIT01)	3,78E-13	9,14E-18	3,94E-15	6,74E-13	7,85E-13	9,81E-07	2,78E-14	2,06E-14
Fold-Change (RH vs, VIT01)	3,40306	5,51859	4,81583	3,22496	7,11032	2,54153	3,52474	6,25652
p-value (RH vs, JAG)	7,69E-21	1,39E-20	2,49E-17	3,69E-20	2,99E-10	6,68E-12	2,65E-16	3,81E-12
Fold-Change (RH vs, JAG)	15,6389	9,81508	7,25953	12,4444	4,29478	6,04776	4,77196	4,17219
p-value (RH vs, FAM07)	4,34E-14	5,36E-16	7,83E-15	3,72E-11	8,42E-08	9,95E-06	2,61E-12	2,82E-13
Fold-Change (RH vs, FAM07)	3,88595	4,134	4,58371	2,6146	2,90567	2,21532	2,75608	5,05483
p-value (RH vs, FAM02)	0,030306	2,32E-14	2,78E-17	3,24E-10	1,86E-06	3,30E-10	4,06E-16	1,65E-12
Fold-Change (RH vs, FAM02)	-1,21296	3,2933	7,18732	2,36341	2,40599	4,37991	4,62916	4,42765
p-value (RH vs, FAM01)	0,054742	8,59E-05	0,009098	0,855422	0,250045	0,02586	0,358792	1,74E-06
Fold-Change (RH vs, FAM01)	1,18443	1,40354	1,27968	1,01526	1,17788	1,40023	1,07377	2,00085
p-value (RH vs, TOJ)	7,81E-14	1,24E-17	1,04E-15	5,44E-11	1,36E-10	5,52E-06	7,46E-14	8,70E-13
Fold-Change (RH vs, TOJ)	3,74413	5,3922	5,31996	2,56713	4,56479	2,29282	3,32845	4,64066
p-value (RH vs, AKO)	0,020348	0,004712	4,70E-05	2,01E-05	0,428301	4,38E-06	0,003584	0,072561
Fold-Change (RH vs, AKO)	1,23172	1,24995	-1,54127	-1,55128	-1,11837	-2,32398	-1,27959	1,22792
p-value (RH vs, MEL)	7,24E-18	6,34E-16	8,75E-14	6,02E-11	7,07E-08	3,46E-05	5,29E-12	7,01E-12
Fold-Change (RH vs, MEL)	7,57388	4,08962	3,89408	2,55471	2,93824	2,06194	2,66232	3,99973
p-value (RH vs, GRO)	0,004114	9,56E-14	0,489737	0,134788	0,323837	0,671653	0,512502	1,34E-08
Fold-Change (RH vs, GRO)	1,30532	3,04899	-1,06266	1,13591	-1,15013	-1,06255	-1,05187	2,54247
p-value (RH vs, WAY)	2,06E-13	3,61E-12	0,002032	0,027539	4,80E-10	7,93E-08	0,011998	0,060792
Fold-Change (RH vs, WAY)	3,52762	-2,54977	-1,35143	-1,21344	4,14465	-2,9753	-1,23039	1,24
p-value (RH vs. PRU)	1,81E-16	5,88E-23	3,09E-16	3,13E-10	3,46E-15	3,04E-17	1,53E-14	4,20E-12
Fold-Change (RH vs. PRU)	6,79856	24,1765	6,93252	2,56982	16,0529	33,5135	4,13332	4,74566
p-value (RH vs. VEG)	1,87E-23	1,15E-22	1,57E-20	6,20E-21	6,93E-15	2,66E-14	5,67E-20	1,76E-16
Fold-Change (RH vs. VEG)	50,8759	22,0449	20,5237	19,8771	14,7011	13,0746	12,2437	12,2274
Map (chromosome: position)	15:1186980..1188824	9:3097861..3100802	14:6639682..6644885	11:2245476..2249210	6:1622608..1623072	3:72935..73936	14:6660633..6662519	12:5504306..5505326
Annotation	hypothetical protein	hypothetical protein	nucleoside-triphosphatase II	hypothetical protein	conserved hypothetical protein	hypothetical protein	nucleoside-triphosphatase I	hypothetical protein
ToxoDB	79.m00015	55.m00103	65.m01111	1.m00014	76.m03393	41.m01274	65.m00001	46.m01717

p-value (RH vs, VIT01)	7,63E-15	1,51E-11	2,38E-13	1,29E-14	3,51E-21	2,52E-12	4,86E-21	9,31E-15	2,00E-10	1,68E-16
Fold-Change (RH vs, VIT01)	6,03475	5,09692	7,66555	7,07417	6,22201	4,69361	7,9906	6,24314	5,31406	5,22249
p-value (RH vs, JAG)	2,22E-17	6,19E-15	1,91E-12	2,00E-11	3,01E-16	1,05E-08	1,43E-17	1,59E-11	1,74E-09	1,14E-18
Fold-Change (RH vs, JAG)	10,48	10,6734	6,31085	3,94889	2,99697	2,72777	4,28066	3,60033	4,43826	7,93839
p-value (RH vs, FAM07)	2,13E-13	6,12E-14	1,88E-10	3,11E-10	1,48E-12	2,97E-14	1,19E-16	2,67E-09	3,82E-09	0,000545
Fold-Change (RH vs, FAM07)	4,6489	8,38742	4,32358	3,3005	2,08829	6,76711	3,74638	2,669	4,1707	1,37162
p-value (RH vs, FAM02)	3,64E-11	8,56E-09	1,74E-07	1,64E-09	3,37E-15	1,07E-15	3,97E-17	4,94E-10	1,02E-05	4,42E-10
Fold-Change (RH vs, FAM02)	3,3026	3,21547	2,72088	2,98419	2,66988	9,31335	4,00799	2,92837	2,39812	2,24907
p-value (RH vs, FAM01)	0,678511	0,051876	7,88E-06	0,050686	2,53E-12	0,000142	1,14E-11	0,000124	0,938569	0,007243
Fold-Change (RH vs, FAM01)	1,04379	1,31402	2,17866	1,26469	2,04884	1,69336	2,15557	1,62207	1,01221	1,26116
p-value (RH vs, TOJ)	4,58E-14	3,21E-10	2,06E-12	1,05E-12	3,15E-18	6,63E-10	3,06E-20	2,51E-12	7,25E-10	3,12E-15
Fold-Change (RH vs, TOJ)	5,22132	4,03036	6,2668	4,89266	3,85668	3,20905	6,78831	4,06779	4,76655	4,24256
p-value (RH vs, AKO)	0,918904	0,003325	0,007974	0,048641	4,02E-12	3,76E-05	8,67E-10	0,242685	0,001697	0,009646
Fold-Change (RH vs, AKO)	-1,01056	-1,54673	1,48467	1,26761	2,01626	-1,80151	1,85005	-1,13417	-1,7388	1,24895
p-value (RH vs, MEL)	1,10E-08	3,11E-11	2,60E-11	4,45E-12	1,72E-15	4,38E-09	5,12E-21	2,49E-10	1,16E-08	0,000197
Fold-Change (RH vs, MEL)	2,4181	4,81121	5,04775	4,39163	2,7542	2,86708	7,9519	3,04513	3,8301	1,41652
p-value (RH vs, GRO)	2,55E-06	0,627253	6,82E-05	1,87E-07	3,06E-12	0,004084	2,61E-14	5,15E-05	0,093228	5,12E-05
Fold-Change (RH vs, GRO)	1,88216	1,06774	1,93355	2,30362	2,03523	-1,44635	2,7995	1,68335	1,31353	1,47817
p-value (RH vs, WAY)	2,32E-14	1,29E-06	0,002404	5,93E-05	8,14E-15	0,381699	1,27E-09	0,00553	1,22E-06	2,99E-06
Fold-Change (RH vs, WAY)	-5,50954	-2,37141	1,59001	-1,74789	2,56677	-1,10872	1,82737	-1,37909	-2,75441	1,6201
p-value (RH vs. PRU)	1,35E-13	1,14E-12	9,17E-13	2,92E-11	1,13E-18	1,01E-15	3,42E-18	1,10E-12	2,79E-10	4,40E-16
Fold-Change (RH vs. PRU)	5,58697	7,58201	8,09292	4,37658	4,70199	11,598	5,46909	4,95299	6,0407	5,65582
p-value (RH vs. VEG)	4,82E-17	2,46E-14	4,23E-14	9,91E-16	5,10E-23	1,42E-15	1,54E-21	2,54E-16	1,90E-12	1,64E-18
Fold-Change (RH vs. VEG)	11,9994	11,3796	11,2618	11,1803	11,18	11,1619	10,976	10,6867	10,0784	9,32514
Map (chromosome: position)	4:181635..183813	10:100876..101568	9:4215714..4217660	3:24538..27247	10:847721..848239	10:44891..49910	12:4393591..4394961	13:1488097..1491197	3:450305..452938	14:529112..530761
Annotation	hypothetical protein	conserved hypothetical protein	polyposis locus protein 1-related	hypothetical protein	cyclophilin, putative	hypothetical protein	60S ribosomal protein L29, putative	purine nucleoside phosphorylase, putative	dual-specificity phosphatase, catalytic domain-containing protein	rhoptry antigen, putative
ToxoDB	64.m00341	44.m05913	55.m04670	41.m01269	44.m02604	44.m04695	46.m02893	583.m00630	41.m00015	551.m00238

p-value (RH vs, VIT01)	7,65E-16	2,58E-15	1,68E-13	1,80E-10	1,93E-10	2,37E-15	1,11E-10	1,01E-10	1,57E-11	0,00013
Fold-Change (RH vs, VIT01)	5,54016	5,05038	5,37533	3,86432	4,24255	3,82867	2,57282	3,80859	3,13663	1,86707
p-value (RH vs, JAG)	2,71E-15	3,97E-20	1,47E-10	3,94E-10	6,22E-09	2,86E-17	1,51E-07	2,25E-12	3,33E-11	3,83E-07
Fold-Change (RH vs, JAG)	5,02729	14,4931	3,33385	3,66174	3,32091	5,17211	1,88572	5,03694	3,00694	2,59752
p-value (RH vs, FAM07)	1,64E-13	2,46E-15	4,03E-11	3,79E-11	3,33E-09	5,92E-16	4,98E-07	1,41E-11	0,00024	2,46E-07
Fold-Change (RH vs, FAM07)	3,79001	5,06833	3,61921	4,32258	3,46342	4,18341	1,80244	4,38081	1,50221	2,66774
p-value (RH vs, FAM02)	1,19E-12	3,50E-11	3,88E-09	3,94E-10	1,55E-05	8,04E-13	1,10E-06	6,76E-09	3,15E-07	0,00072
Fold-Change (RH vs, FAM02)	3,35745	2,78881	2,75181	3,66186	2,08021	2,77302	1,75028	2,91353	1,94346	1,70162
p-value (RH vs, FAM01)	0,111133	0,000171	0,002973	0,05442	8,38E-06	0,91044	0,43606	0,38972	0,00093	2,68E-06
Fold-Change (RH vs, FAM01)	1,15586	1,47934	1,44331	1,28924	2,15175	1,00825	-1,07008	1,11128	-1,42682	-2,31824
p-value (RH vs, TOJ)	1,39E-14	3,84E-14	4,50E-11	3,85E-10	9,90E-09	4,69E-15	2,86E-09	1,14E-08	9,41E-09	0,00418
Fold-Change (RH vs, TOJ)	4,46605	4,16935	3,59363	3,66718	3,22056	3,67178	2,2166	2,82475	2,26354	1,54185
p-value (RH vs, AKO)	0,082858	6,53E-05	0,110143	0,050305	0,16568	1,62E-07	2,17E-06	0,15196	2,65E-05	1,09E-09
Fold-Change (RH vs, AKO)	-1,17178	-1,53027	1,20152	-1,29552	-1,21227	-1,70549	-1,70762	-1,19523	-1,63165	-3,80606
p-value (RH vs, MEL)	8,01E-14	2,24E-15	1,88E-10	1,08E-09	1,01E-10	1,35E-15	9,22E-11	3,19E-09	7,67E-09	0,02724
Fold-Change (RH vs, MEL)	3,9684	5,10471	3,28316	3,42407	4,4534	3,96646	2,59575	3,04787	2,28484	1,37874
p-value (RH vs, GRO)	2,49E-08	0,001702	0,001402	0,000538	0,008362	4,96E-05	0,35913	0,00036	0,00041	0,01015
Fold-Change (RH vs, GRO)	2,05808	1,36423	1,4934	1,65467	1,47384	1,43237	-1,08324	1,65339	1,47248	-1,46437
p-value (RH vs, WAY)	8,28E-08	2,69E-06	0,004594	1,11E-07	0,002923	5,55E-11	1,21E-05	4,88E-07	2,26E-10	3,20E-13
Fold-Change (RH vs, WAY)	-1,95975	-1,71584	-1,41463	-2,57965	1,56442	-2,28725	-1,60661	-2,29525	-2,71364	-7,46591
p-value (RH vs. PRU)	3,00E-15	1,25E-15	2,43E-11	8,29E-10	1,36E-08	1,90E-15	4,11E-10	2,69E-11	1,67E-13	3,95E-06
Fold-Change (RH vs. PRU)	5,81643	6,2617	4,24349	3,92418	3,51967	4,41879	2,63025	4,79031	4,76815	2,45179
p-value (RH vs. VEG)	2,77E-17	2,90E-17	5,28E-15	1,53E-13	1,02E-12	2,37E-18	2,13E-16	4,28E-13	1,14E-14	3,93E-11
Fold-Change (RH vs. VEG)	8,86441	8,83414	8,73738	8,16215	7,81261	7,49597	6,98447	6,8156	5,88475	5,6921
Map (chromosome: position)	1:694954..701809	7:2789563..2792107	8:1426984..1428787	10:6166610..6166710	12:5005049..5008599	7:992043..995095	8:2568143..2568937	8:2785141..2787341	14:315518..318466	12:1487555..1490533
Annotation	glucose-6-phosphate dehydrogenase	p36 protein	fatty acid elongation protein-related	hypothetical protein	sedoheptulose-1,7 bisphosphatase, putative	SCP-like extracellular domain-containing protein	dense granule protein 7	conserved hypothetical protein	hypothetical protein	calmodulin-domain protein kinase, putative
ToxoDB	83.m00004	49.m00048	20.m00392	59.m06125	46.m01668	49.m00025	20.m00005	20.m03765	145.m00583	42.m03509

II. 3. ANALYSE DU PROFIL IMMUNOLOGIQUE DES SOUCHES DE T. GONDII CHEZ LA SOURIS

II. 3. 1. Méthodologie

Afin d'étudier la réponse immunitaire à une infection à T. gondii, nous avons utilisé le kit Milliplex® MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – Premixed 25-plex (Millipore). Ce kit étant extrêmement onéreux, seulement 8 des 13 souches étudiées ont fait l'objet de ce dosage. Les souches sélectionnées représentent les 3 souches de référence : type I (RH), type II (PRU et type III (VEG), 2 souches isolées de patients : MEL (toxoplasmose sévère avec complications cardiaques) et AKO (toxoplasmose très sévère avec passage en réanimation), 1 souche isolée de la faune sauvage (VIT0001) et 1 de la faune domestique (FAM0001) ainsi la souche isolée du jaguar (félidé sauvage).

4 groupes de 4 souris ont reçu une injection péritonéale de 500 tachyzoïtes de chacune des souches sélectionnées. Chaque groupe de souris est euthanasié à J1, J2, J4 et J7 post infection. Le sérum est recueilli pour chaque souris du groupe correspondant. En parallèle, le sérum d'un groupe témoin de 4 souris non infectées est également recueilli aux mêmes temps. Ce kit permet, avec 25 µl de sérum suivant les recommandations du fournisseur, un dosage simultané de 25 cytokines – chemokines :

GCSF (Granulocyte-colony stimuling factor) est une glycoprotéine qui stimule la moelle osseuse pour la production de granulocytes et de cellules souches. Elle participe également à la prolifération et à la différentiation des précurseurs des neutrophiles (Tay et al. 2017)

GMCSF (Granulocyte-marcophage colony stimuling factor) à un peu la même fonction que la GCSF puisque c'est une glycoprotéine qui favorise la prolifération et la maturation des neutrophiles mais aussi de plusieurs types cellulaires comme les macrophages ou les éosinophiles (Francisco-Cruz et al. 2014).

IFN-γ (Interféron gamma) est une cytokine importante pour le système immunitaire car elle intervient dans l'immunité innée et adaptative. Principalement produite par les cellules NK et NKT ainsi que par les lymphocytes CD4 et CD8, elle participe à l'activation des macrophages et induit l'expression des molécules du système majeur d'histocomptabilité (Schoenborn and Wilson 2007).

IL-1α (Interleukine-1 alpha), principalement produite par les cellules épithéliales permet l'activation des macrophages et des neutrophiles. Elle joue aussi un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire en se fixant à un récepteur spécifique de la voie d'activation du TNF-α (Dinarello 1997).

IL-1β (Interleukine-1 beta) est un médiateur de la réponse inflammatoire et est produite par les macrophages activées (March et al. 1985).

IL-2 (Interleukine-2) est sécrété par les lymphocytes T helpers (LTh0) activés par les cellules présentatrices d'antigènes. Elle permet de réguler la transformation de ces LTh0 en d'autres formes de LTh en combinaison avec d'autres cytokines (IL-4 ou IL-12) (Liao et al. 2011).

IL-4 (Interleukine-4) intervient à la suite de l'IL-2 en induisant la différentiation des lymphocytes natifs Th0 en lymphocytes Th2 (réponse humorale) qui vont eux-mêmes produire de l'IL-4 augmentant ainsi la prolifération des LTh2.

IL-5 (Interleukine-5) est un médiateur important dans l'activation des polynucléaires éosinophiles. Elle va se lier à un récepteur spécifique ce qui entraine la croissance des lymphocytes B et la sécrétion d'immunoglobulines, essentiellement des IgA.

IL-6 (Interleukine-6) est sécrétée par les lymphocytes T ainsi que par les macrophages. Elle est impliquée, au même titre que l'IL1β lors de la phase de l'infection aiguë (Heinrich et al. 1998).

IL-7 (Interleukine-7) permet la prolifération et joue un rôle important dans leur différentiation. Elle est produite dans la moelle osseuse ou le thymus ainsi que par les cellules dendritiques et les cellules épithéliales (Kroncke et al. 1996; Watanabe et al. 1995).

IL-9 (Interleukine-9), sécrétée principalement par les lymphocytes T helper (Th9) mais aussi par les cellules Natural Killers et les lymphocytes T type 2 (Th2) sous l'induction de l'interleukine 33 (Humphreys et al. 2008). Une fois connectée à son récepteur, l'IL-9 stimule la prolifération cellulaire et prévient de l'apoptose (Jia and Wu 2014).

IL-10 (Interleukine-10) est produite essentiellement par les monocytes et dans une moindre mesure par les lymphocytes T de type Th2. Elle a plusieurs fonctions, notamment de réguler à la baisse l'expression des cytokines de la voie Th1 mais aussi d'améliorer la prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps (Mosser and Zhang 2008).

IL-12(p40) et IL-12(p70) sont 2 formes de l'interleukine-12. La forme p70 est composée d'un hétérodimer (p35 et p40). La forme p40 est composée d'un homodimer de p40. Elle est produite par les cellules dendritiques ainsi que par les macrophages pour induire la différentiation des lymphocytes T natifs en lymphocytes Th1. Elle permet également la stimulation de la production d'IFN-γ et de TNF-α par les lymphocytes NK et les lymphocytes T CD8+ (Liu et al. 2005).

IL-13 (Interleukine-13) est sécrétée surtout par les lymphocytes T (Th2) mais aussi par les monocytes, les éosinophiles, les lymphocytes B et les lymphocytes NK. Son rôle est similaire à l'IL-4 mais n'intervient pas dans le processus initial de transformation des lymphocytes natifs vers le profil Th2 (Granel et al. 2007).

IL-15 (Interleukine-15) est produite par plusieurs types cellulaires : monocytes, macrophages, cellules dendritiques ou fibroblastes. Son rôle est double puisqu'elle participe dans un premier temps à la prolifération des lymphocytes NK (Nguyen et al. 2002) lors de la réponse immunitaire innée, mais aussi dans un deuxième temps, dans le maintient de la survie des lymphocytes T 'mémoire' en l'absence d'antigène pour la réponse immunitaire adaptative (Schluns et al. 2002).

IL-17 (Interleukine-17) est produite essentiellement par certains lymphocytes T CD4 appelés LTh17 (Harrington et al. 2005). Elle stimule plusieurs types cellulaires (macrophages, monocytes, fibroblastes, cellules épithéliales) induisant la sécrétion de plusieurs autres cytokines (IL-6, GCSF, GMCSF, IL-1β, TNF-α) ou chemokines comme l'IL-8 qui intervient dans le recrutement des neutrophiles (Fossiez et al. 1996).

IP10 (interferon gamma-induced protein ou CXCL10) est produite par les monocytes, les cellules épithéliales et les fibroblastes après une stimulation à l'IFN-γ. Sa production est liée à une activation de la voie Th1, ce qui entraine un recrutement des lymphocytes T activés sur le site de l'inflammation (Dufour et al. 2002).

KC (CXCL1) est exprimé dans les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales. Elle participe au recrutement des neutrophiles (Iida and Grotendorst 1990; Schumacher et al. 1992).

MCP (Monocyte ChemoAttractant ou CCL2) est produite par plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales, les macrophages ou les fibroblastes pour permettre le recrutement des monocytes et des lymphocytes (Deshmane et al. 2009).

MIP1α et MIP1β (Macrophage Inflammatory Protein1-alpha ou CCL3 et Macrophage Inflammatory Protein1-beta ou CCL4) sont issue de la même famille. Elles sont produites au niveau des macrophages, des cellules dentritiques et des lymphocytes pour activer les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) lors d'une infection bactérienne (Maurer and von Stebut 2004).

RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted ou CCL5) est exprimée au niveau des cellules épithéliales et des plaquettes, et agit comme un puissant chimioattractant pour les monocytes et les lymphocytes NK, les lymphocytes T 'mémoire' les éosinophiles et les cellules dendritiques lors d'une infection virale (Crawford et al. 2011).

TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha) est une des cytokines à l'origine de la réaction immunitaire aiguë. Elle est secrétée essentiellement par les macrophages activés mais aussi par les lymphocytes CD4+, les lymphocytes NK, les neutrophiles et les éosinophiles. Le TNF-a active la transcription de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-18) et chemokines (GM-CSF, G-CSF) pour amplifier la réponse immunitaire (Wajant et al. 2003).

La lecture s'effectue à l'aide d'un lecteur utilisant la technologie Luminex®. Cette technologie récente repose sur le principe de la cytométrie en flux, alliant l'utilisation de microbilles fluorescentes et une double lecture après excitation par 2 lasers : le premier permettant d'identifier la microbille et le second sert à la détection de l'analyte (**Figure 41**).

Les microbilles servent de support solide pour la fixation de différentes molécules se liant de façon covalente à d'autres molécules : antigènes, peptides ou sondes nucléotidiques. Chaque bille aura son propre code couleur d'identification et une seule sorte de molécule. Plusieurs billes (jusqu'à 100 actuellement) peuvent être mélangées dans un seul tube, ce qui multiplie les possibilités d'analyses (Fulton et al. 1997; Vignali 2000).

La détection de la molécule à analyser (analyte) se fait via une molécule de détection (conjugué) qui a une forte affinité pour l'analyte Le conjugué est couplé à une molécule fluorescente dont la longueur d'onde diffère de celle émise par les microbilles. De cette façon, lors du passage de la microbille entre les lasers, la classification des microbilles et la quantification de l'analyte sont effectués en même temps.

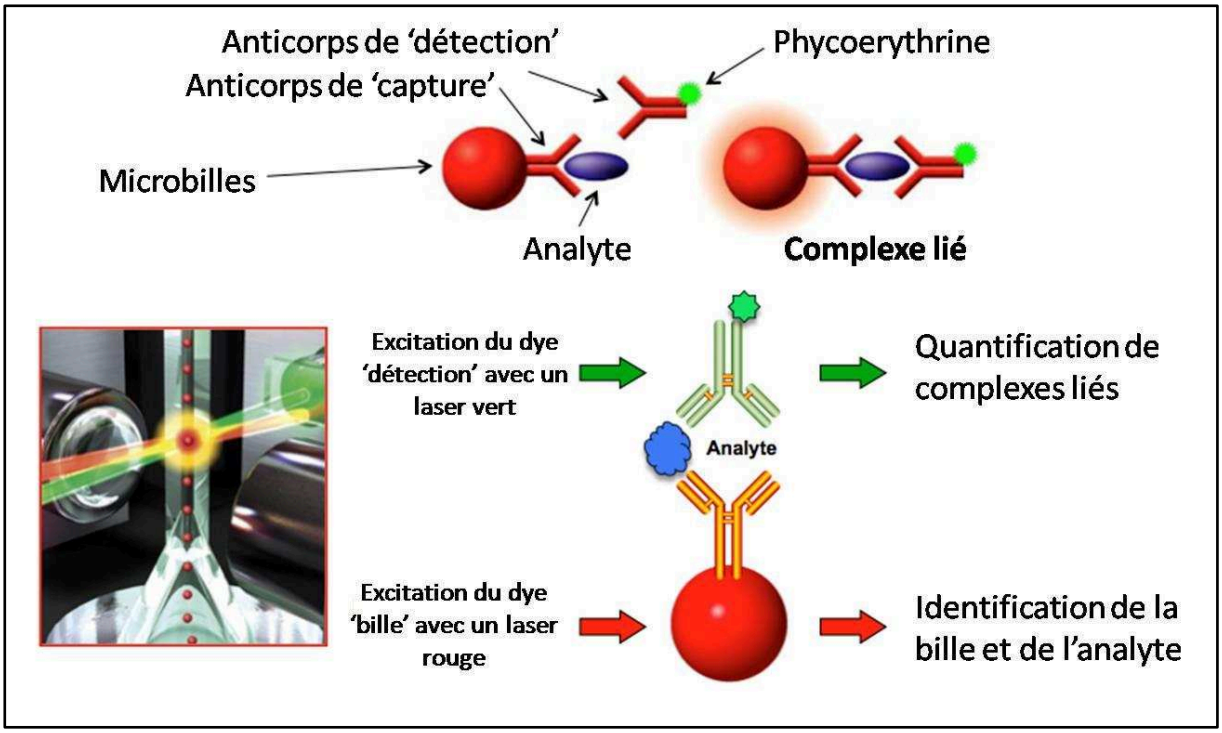


Figure 41 : Principe de la technologie Luminex

II. 3. 2. Analyses statistiques

Afin d'optimiser la lecture des résultats, une stratégie d'analyse a été utilisée. Tout d'abord, un ratio a été calculé pour chaque point de la cinétique par rapport au point H=0 (taux référence post infection). Ce ratio est ensuite converti en Log10 pour renforcer la robustesse des statistiques.

Le traitement de ces données dans le logiciel PERSEUS (Computational Systems Biochemistry ; Tyanova and Cox 2018) a permis de générer des Heatmaps ainsi qu'un Hierachical Clustering. On peut ainsi visualiser une éventuelle augmentation du taux des cytokines/chemokines par rapport au référentiel H=0 puis regrouper ces cytokines en cluster. Les données sont également transférées sous 'R' (R Development Core team 2016) pour une analyse de positionnement multidirectionnel 'MDS' (MultiDirectionnal Scaling) – analyse linéaire discriminante 'LDA' (Linear Disciminant Analysis) afin d'avoir une visualisation en 2D du positionnement de ces souches les unes par rapport aux autres.

II. 3. 3. Résultats des dosages

Les données brutes recueillies après l'analyse au Luminex sont regroupées en **Annexe 9** afin de ne pas surcharger la présentation. Les quelques graphiques conservé dans cette partie (**Figure 42**) représentent des exemples significatifs de la réponse de certaines cytokines comme le G-CSF ou l'IFN-γ. Nous notons que le dosage de l'IL-9 n'apparait pas

dans les données. Pour l'ensemble des plaques, cette interleukine n'a pas été dosée sans que nous puissions l'expliquer techniquement. Les analyses ont été faites sur 24 cytokines/chemokines.

L'infection à T. gondii induit un mécanisme de défense de l'hôte avec une augmentation de la production de certaines cytokines, différentes selon la souche impliquée.

La souche RH provoque une production très importante de certaines cytokines par rapport aux 2 autres souches de référence. Le **Tableau 13** donne un exemple de dosage de cytokines des 3 souches de référence. On constate que la réponse immunitaire face à la souche RH est beaucoup plus accentuée que pour les souches PRU et VEG. En effet, la quantité d'IFN-γ est multipliée par 1617 alors qu'elle n'est multipliée que par 440 pour PRU et par 385 pour VEG. Il en est de même pour le G-CSF qui augmente d'un facteur x828. Cette augmentation est plus modérée pour PRU et VEG qui est respectivement de x28 et de x20.

Tableau 13 : Exemple de production de cytokines pour les 3 souches de référence
Les dosages à H0 correspondent au groupe témoin en comparaison avec les dosages à H168 des groupes injectés avec les différentes souches. Le facteur correspond à la différence entre la valeur à H0 et la valeur à H168

	RH		PRU		VEG	
	H0 (pg/ml)	H168 (pg/ml)	H0 (pg/ml)	H168 (pg/ml)	H0 (pg/ml)	H168 (pg/ml)
G-CSF	72,9	60326,4	72,9	2050,1	72,9	1428,4
	x 828		**x 28**		**x 20**	
IFN-g	8,8	14233,8	8,8	3871,5	8,8	3389,7
	x 1617		**x 440**		**x 385**	
IL-5	6,6	453	6,6	24,7	6,6	19,1
	x 69		**x 4**		**x 3**	
IL-6	16,5	4416,3	16,5	82,9	16,5	72,8
	x 268		**x 5**		**x 4**	
MCP1	72,9	17668,8	72,9	239,9	72,9	157,9
	x 242		**x 3**		**x 2**	
TNF-a	9,1	572,4	9,1	68,6	9,1	35,9
	x 63		**x 8**		**x 4**	

En ce qui concerne les souches guyanaises, la réponse immunitaire n'est pas aussi exacerbée qu'avec la souche RH mais le taux de certaines cytokines est bien plus élevé qu'avec les souches PRU ou VEG. C'est le cas pour :

- IL-12p40 où les taux à H168 sont compris entre 123,6 et 189,1 pg/ml (278,4 pg/ml pour RH et 90,0 pg/ml pour PRU).

- IL-15 où les taux sont compris entre 409,6 et 664,1 pg/ml (749,9 pg/ml pour RH et 128,0 pg/ml pour PRU).

L'analyse sous Perseus (**Figure 43**) qui permet de visualiser la variation des taux de cytokines/chemokines par souche et en fonction du temps pointe de façon très évidente la différence entre la souche RH et les autres souches de référence.

Pour RH, 2 clusters de cytokines/chemokines se distinguent :

- le premier qui commence à apparaitre dès 96h. post infection, est composé de L'interféron-γ, IL12p40, KC, IL-15, TNF-α, IL1β, IP10, IL-6 et GCSF,
- le second est composé de MIP1β, IL-10, IL-5, IL-17 (dans une moindre mesure), IL12p70, IL-7 et IL-2.

La production d'IL-12, d'IFN-γ et de TNF-α est bien liée à une réponse immunitaire du type Th1 (**cf. I. 9. 1**).

Le profil de PRU et VEG est très différent. Comme nous l'avons vu sur les données 'brutes', l'intensité de production des cytokines/chemokines est nettement plus faible pour ces souches. Cependant un cluster consensus se dégage (faiblement) à 168h. post infection avec :

- l'IFN-γ, IP10, TNF-α, IL-15, IL-2 IL-12p40 et GCSF.

Le cluster de la souche PRU comprend en plus :

- IL-12p70, IL1β et IL-10.

Comme avec la souche RH, le fait d'avoir une production d'IL-12, d'IFN-γ et de TNF-α nous oriente vers une réponse de type Th1 qui est cependant bien moins marquée que pour la souche RH.

Au total, les taux de production des cytokines 'activées' sont beaucoup plus élevées pour RH indiquant une réponse immunitaire très intense contrairement aux 2 autres souches pour qui la production des cytokines 'activées' est plus modérée. D'autre part, un cluster 'consensuel' se dégage sur les 3 souches avec la production d'IP10, TNF-α, IL-15, IL-2 IL-12p40, GCSF et IFN-γ indiquant l'activation de la voie Th1.

En ce qui concerne les souches guyanaises, le profil est différent et un cluster 'consensuel' se dessine pour toutes les souches. On retrouve l'IFN-γ, l'IL-12p40, l'IL-15,

GCSF et IP10 mais avec des taux qui varient en fonction des souches. Ce cluster est quasi identique à celui des 2 souches de référence PRU et VEG, à ceci près que l'analyse fait pas ressortir le TNF-α pour les souches guyanaises. D'autre part, on constate que la souche JAG présente des taux de cytokines un peu plus faibles que pour les autres souches guyanaises, impliquant la possibilité d'une réaction immunitaire moins importante. Ce cluster fait intervenir au moins 3 cytokines (l'IFN-γ, l'IL-12p40 et IL-15) connues pour orienter la réponse immunitaire innée vers une activation des lymphocytes T (Th1). Elles sont donc responsables du contrôle de la réplication du parasite. Par contre, on ne retrouve pas d'activation des cytokines liées au contrôle de la réponse immunitaire comme l'IL-10. L'IP10 est une chemokine qui intervient dans le recrutement des lymphocytes T activés vers le site de l'inflammation après activation de la voie Th1 et le G-CSF stimule la moelle osseuse pour la production des granulocytes. Toutes ces cytokines/chemokines sont bien exprimées dans le seul but de contenir la prolifération du parasite à l'intérieur de l'hôte.

Les résultats sont résumés dans le **Tableau 14** ci-dessous.

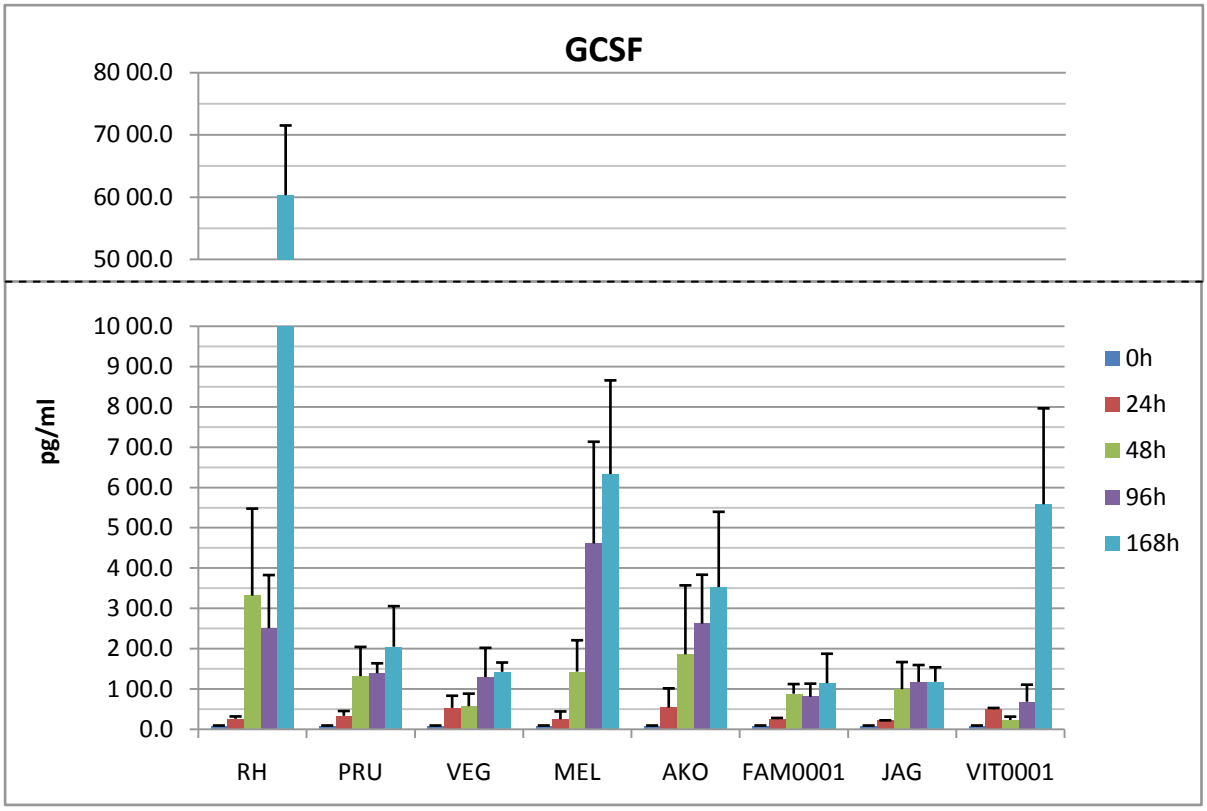
Tableau 14 : Cytokines - chemokines produites
après infection des souris avec différentes souches de T. gondii.

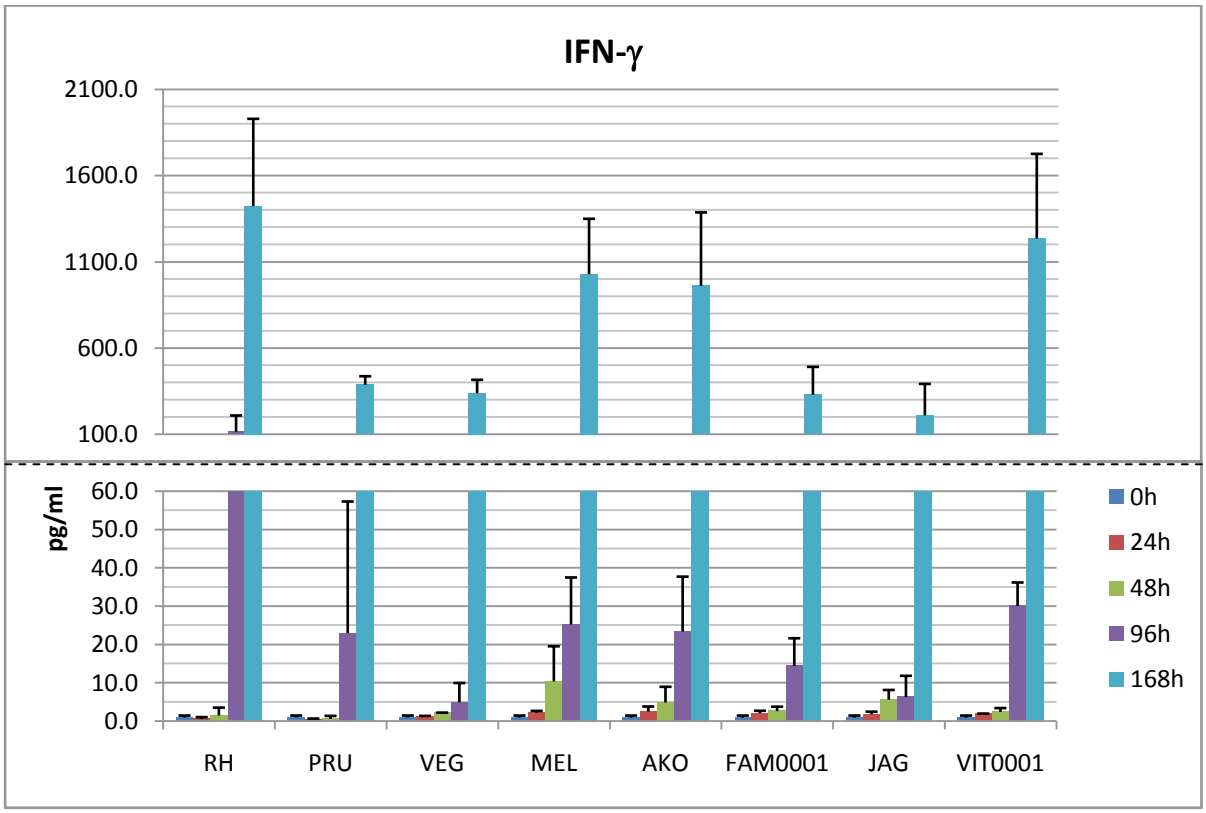
	RH	PRU	VEG	Souches guyanaises
IFN-g	X	X	X	X
IL12p40	X	X	X	X
KC	X			
IL-15	X	X	X	X
TNF-a	X	X	X	
IL1b	X			
IP10	X			
IL-6	X			
GCSF	X	X	X	X
MIP1b	X			
IL-10	X			
IL-5	X			
IL-17	X			
IL12p70	X	X		
IL-7	X			
IL-2	X	X	X	
IP10		X		
IL1b		X		
IL-10		X	X	X

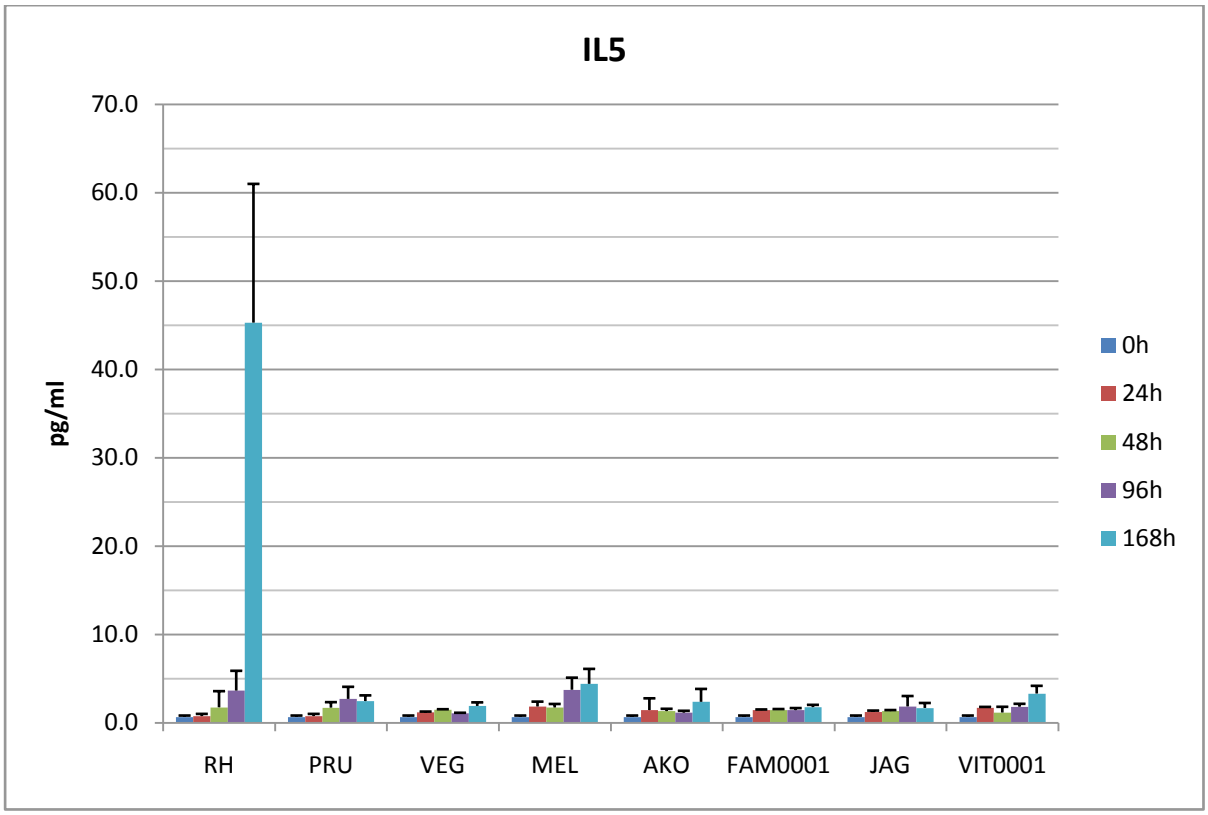
L'analyse MDS-LDA sous R permet une visualisation sous un format 2D afin de répartir les souches les unes par rapport aux autres. Lors des premières 24h, il ne se dégage pas de profil particulier et les souches restent relativement groupées. A partir de 48h, les souches RH et PRU se démarquent nettement de l'ensemble des autres souches. Les souches VEG et JAG sont 'imbriquées' signifiant un comportement identique en terme d'activation des cytokines. Cette tendance semble se confirmer à 96h. RH et PRU se séparent de l'ensemble des souches guyanaises, alors que VEG et JAG continuent de s'associer. Et à 168h, RH est vraiment très éloignée des autres groupes, confirmant que cette souche a un profil immunologique bien particulier. PRU et FAM0001 se rapprochent tandis que VEG et JAG ont presque fusionnées. Le groupe MEL, AKO et VIT0001 reste étroitement lié.

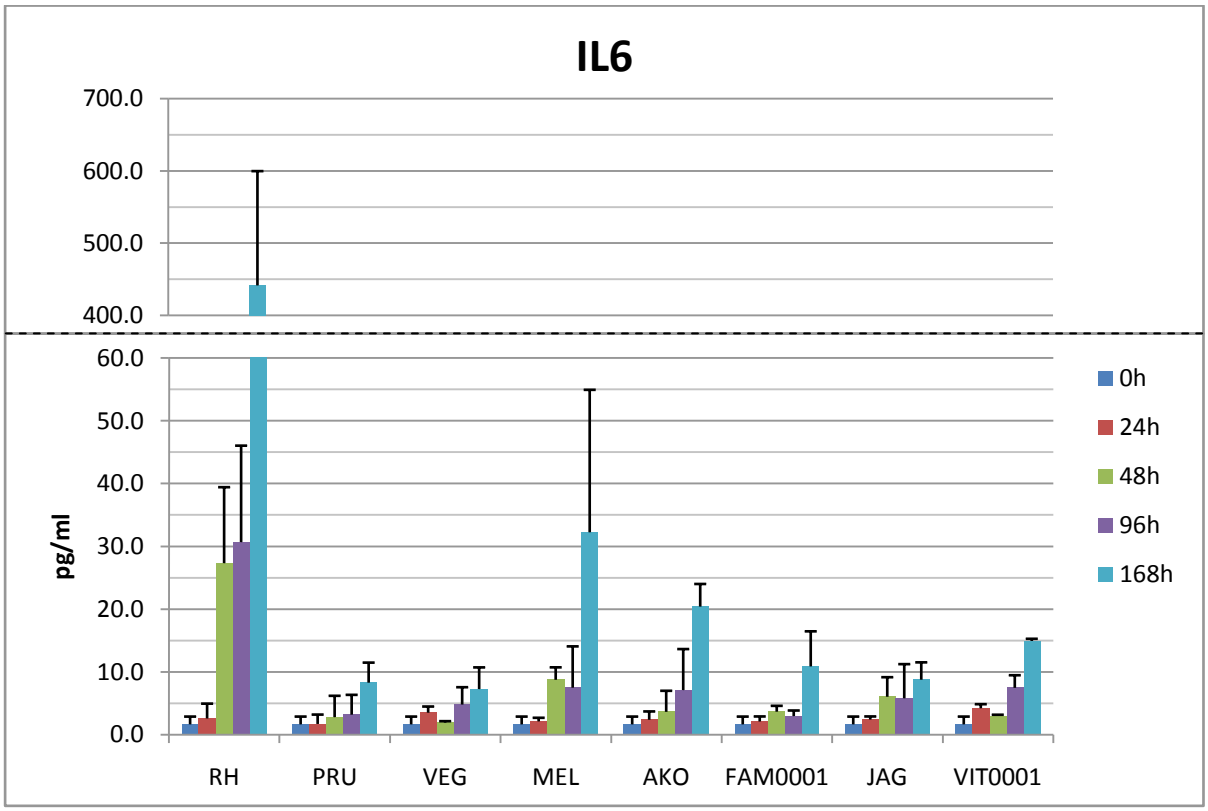
Vu que la disparité de RH par rapport aux autres souches pourrait apporter un biais dans l'analyse, notamment à 168h, nous avons effectué une nouvelle analyse en ne prenant pas en compte le profil de RH (**Figure 45**). Les profils de MEL, AKO et VIT0001 restent associés et groupés. Les profils des autres souches se distinguent les uns des autres avec des profils bien distincts pour chacune des souches. On relève toutefois la proximité des profils mais sans aires communes pour PRU et FAM001, JAG et VEG, indiquant une similitude entre les profils d'activation des cytokines dans l'infestation de ces souches.

Cette analyse immunologique nous permet de mettre en évidence la réponse de certaines cytokines-chemokines de l'hôte face à une infection à T. gondii et donc fournit le profil immunologique des souches guyanaises, qui jusqu'à ce jour n'avait pas été décrit. Une infection par la souche RH déclenche une réaction exacerbée du système immunitaire de l'hôte. En effet, en post-infestation, les cytokines comme l'IFN-γ ou le G-CSF présentent des taux majorés d'un facteur 100 ou 1000, à l'inverse de l'infestation par les autres souches de référence (PRU et VEG) qui provoquent une augmentation plus modérée des taux (facteur 10 à 100).


GCSF
80 00.0
70 00.0
60 00.0
50 00.0
pg/ml
10 00.0
9 00.0
8 00.0
7 00.0
6 00.0
5 00.0
4 00.0
3 00.0
2 00.0
1 00.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h


IFN-γ
2100.0
1600.0
1100.0
600.0
100.0
pg/ml
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h


IL5
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h


IL6
700.0
600.0
500.0
400.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

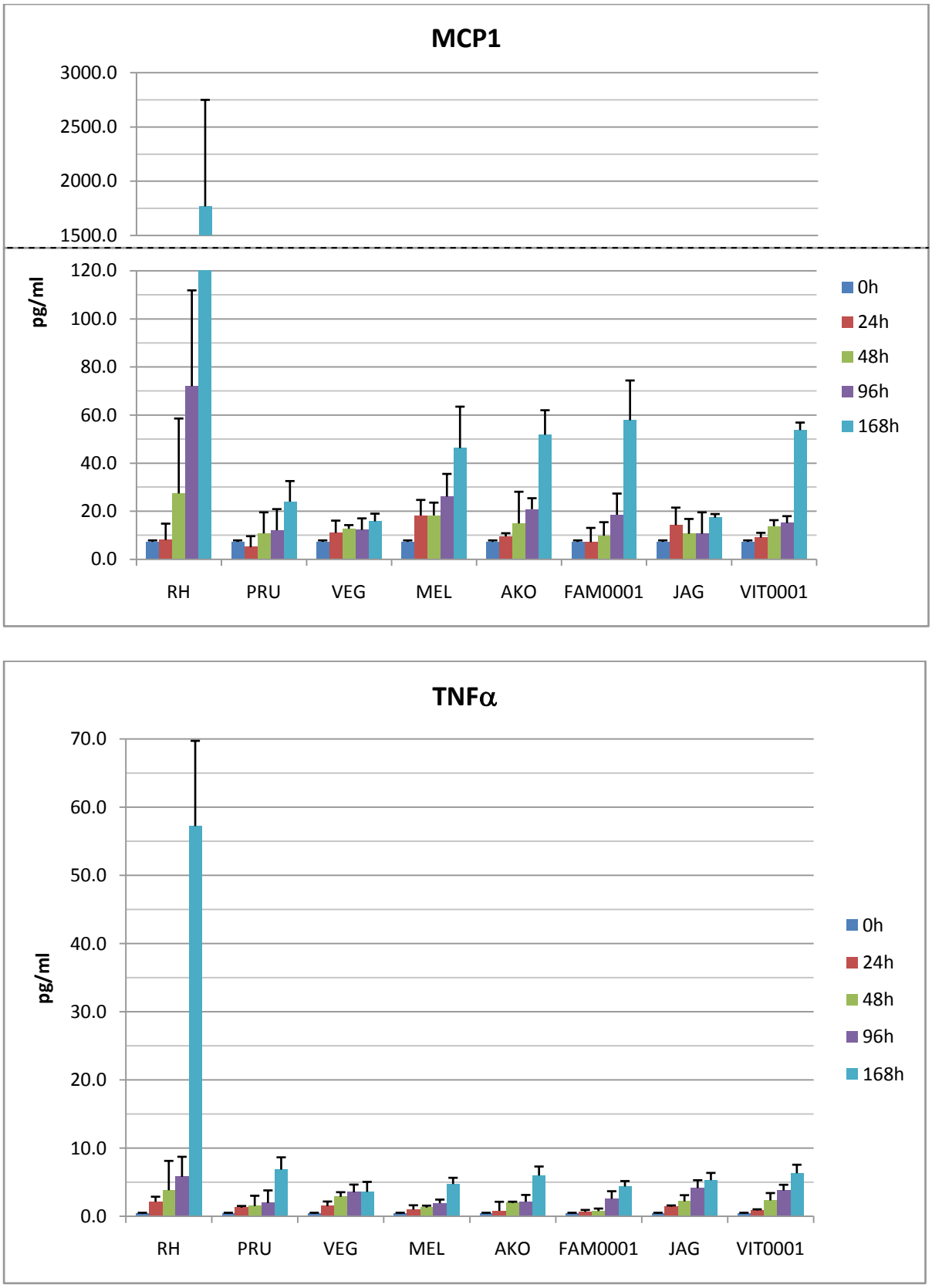
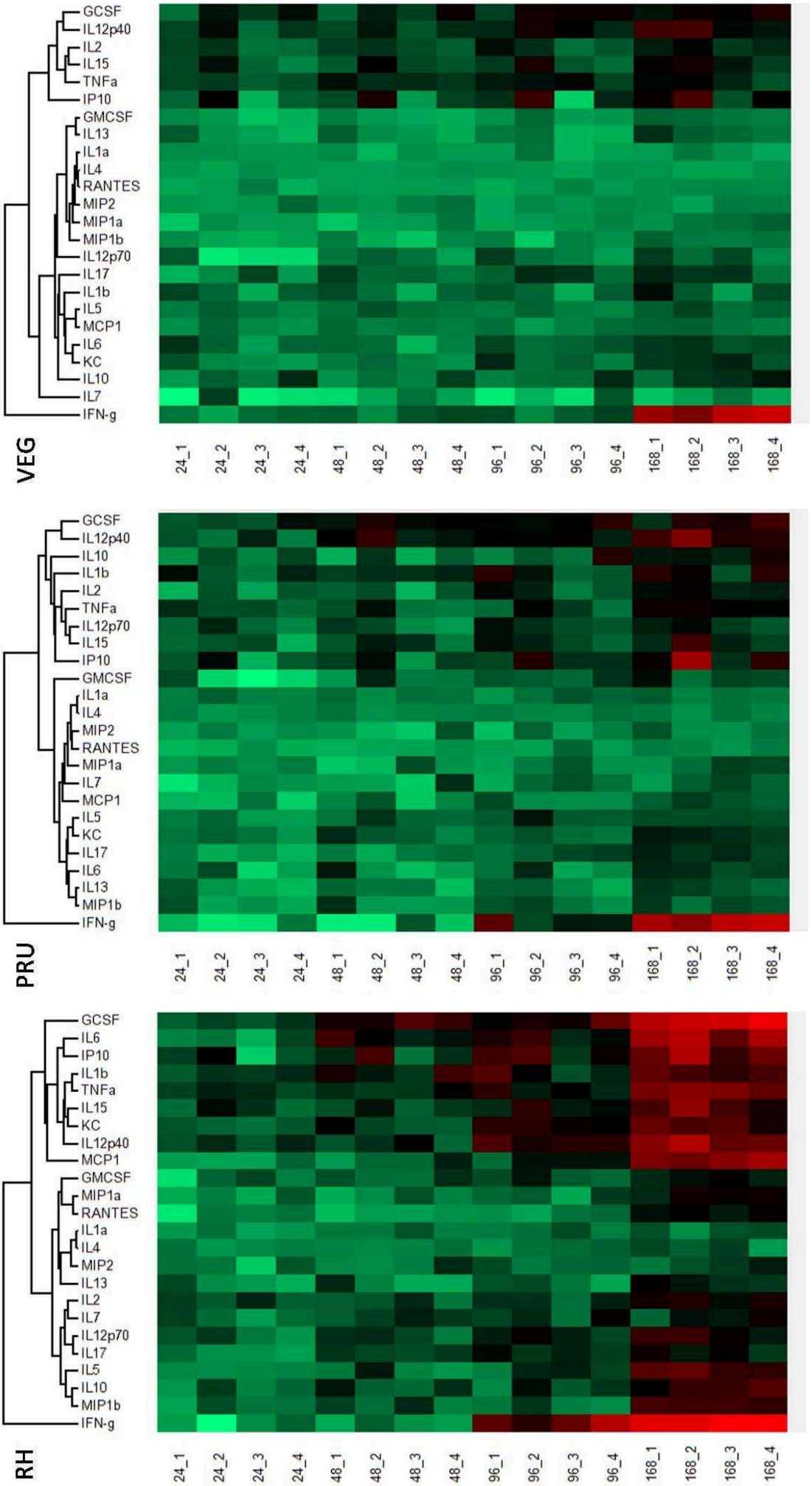
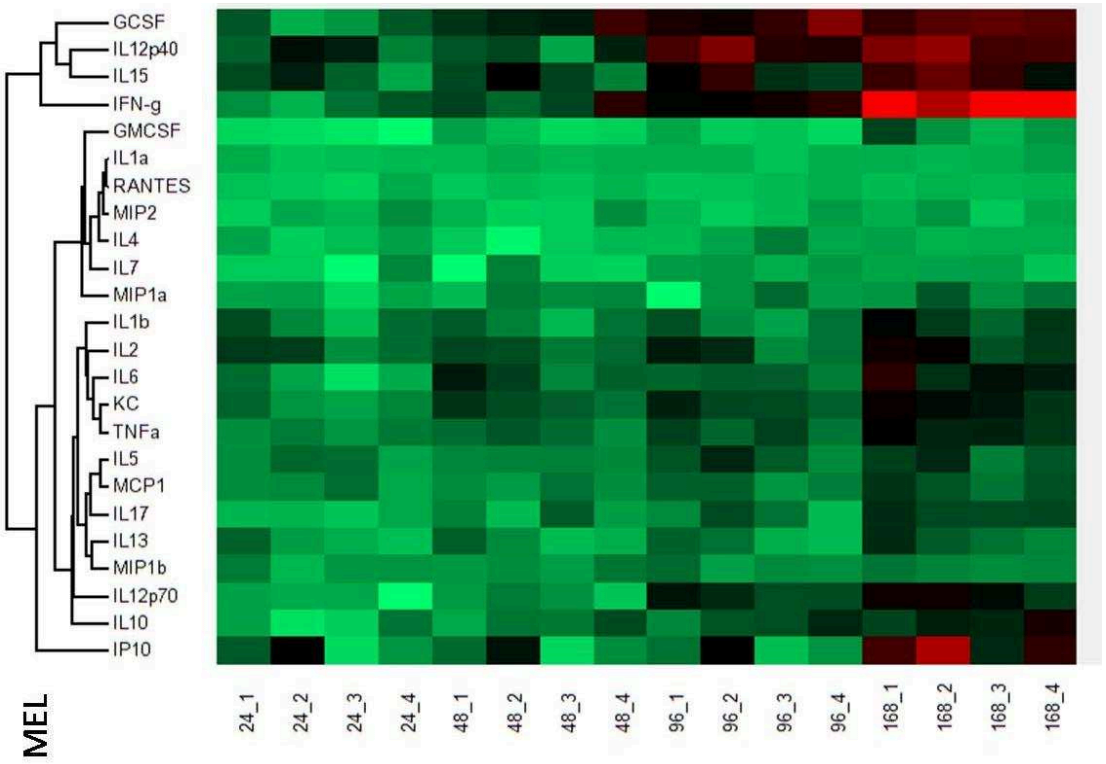
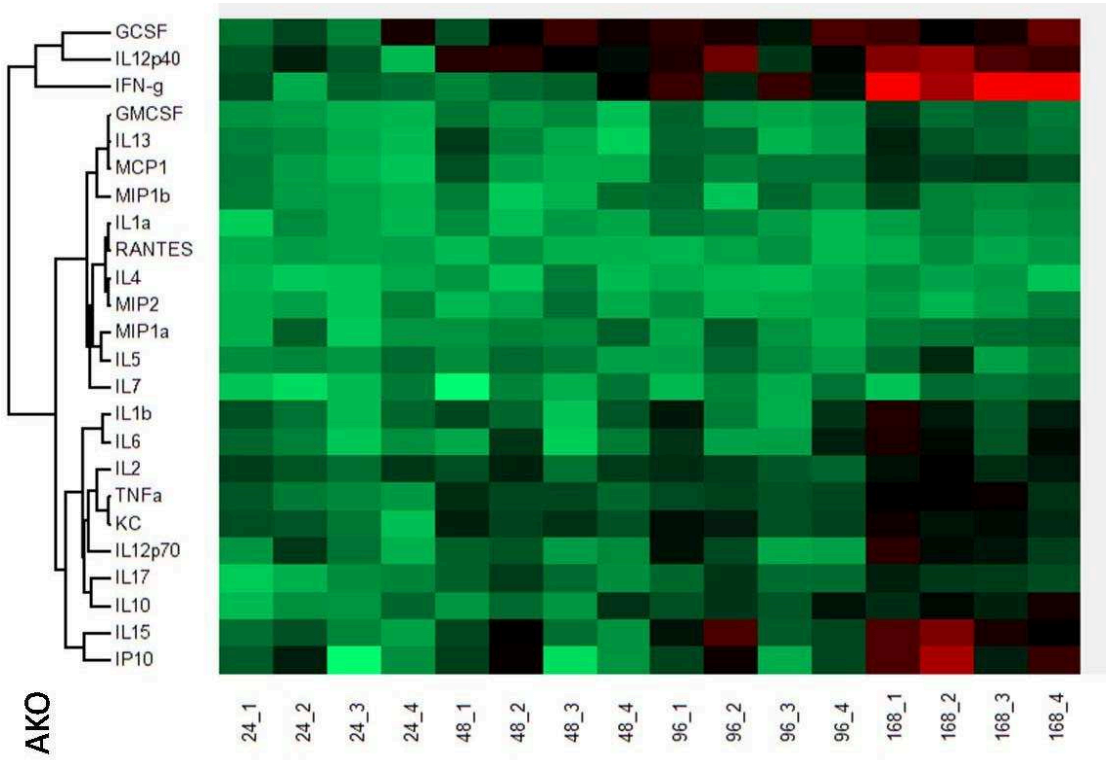


Figure 42 : Courbes de dosage de certaines cytokines – chemokines chez la souris selon les souches


VEG
GCSF
IL12p40
IL2
IL15
TNFa
IP10
GMCSF
IL13
IL1a
IL4
RANTES
MIP2
MIP1a
MIP1b
IL12p70
IL17
IL1b
IL5
MCP1
IL6
KC
IL10
IL7
IFN-g
24_1
24_2
24_3
24_4
48_1
48_2
48_3
48_4
96_1
96_2
96_3
96_4
168_1
168_2
168_3
168_4
PRU
GCSF
IL12p40
IL10
IL1b
IL2
TNFa
IL12p70
IL15
IP10
GMCSF
IL1a
IL4
MIP2
RANTES
MIP1a
IL7
MCP1
IL5
KC
IL17
IL6
IL13
MIP1b
IFN-g
24_1
24_2
24_3
24_4
48_1
48_2
48_3
48_4
96_1
96_2
96_3
96_4
168_1
168_2
168_3
168_4
RH
GCSF
IL6
IP10
IL1b
TNFa
IL15
KC
IL12p40
MCP1
GMCSF
MIP1a
RANTES
IL1a
IL4
MIP2
IL13
IL2
IL7
IL12p70
IL17
IL5
IL10
MIP1b
IFN-g
24_1
24_2
24_3
24_4
48_1
48_2
48_3
48_4
96_1
96_2
96_3
96_4
168_1
168_2
168_3
168_4


GCSF
IL12p40
IL15
IFN-g
GMCSF
IL1a
RANTES
MIP2
IL4
IL7
MIP1a
IL1b
IL2
IL6
KC
TNFa
IL5
MCP1
IL17
IL13
MIP1b
IL12p70
IL10
IP10
MEL
24_1
24_2
24_3
24_4
48_1
48_2
48_3
48_4
96_1
96_2
96_3
96_4
168_1
168_2
168_3
168_4


GCSF
IL12p40
IFN-g
GMCSF
IL13
MCP1
MIP1b
IL1a
RANTES
IL4
MIP2
MIP1a
IL5
IL7
IL1b
IL6
IL2
TNFa
KC
IL12p70
IL17
IL10
IL15
IP10
AKO
24_1
24_2
24_3
24_4
48_1
48_2
48_3
48_4
96_1
96_2
96_3
96_4
168_1
168_2
168_3
168_4

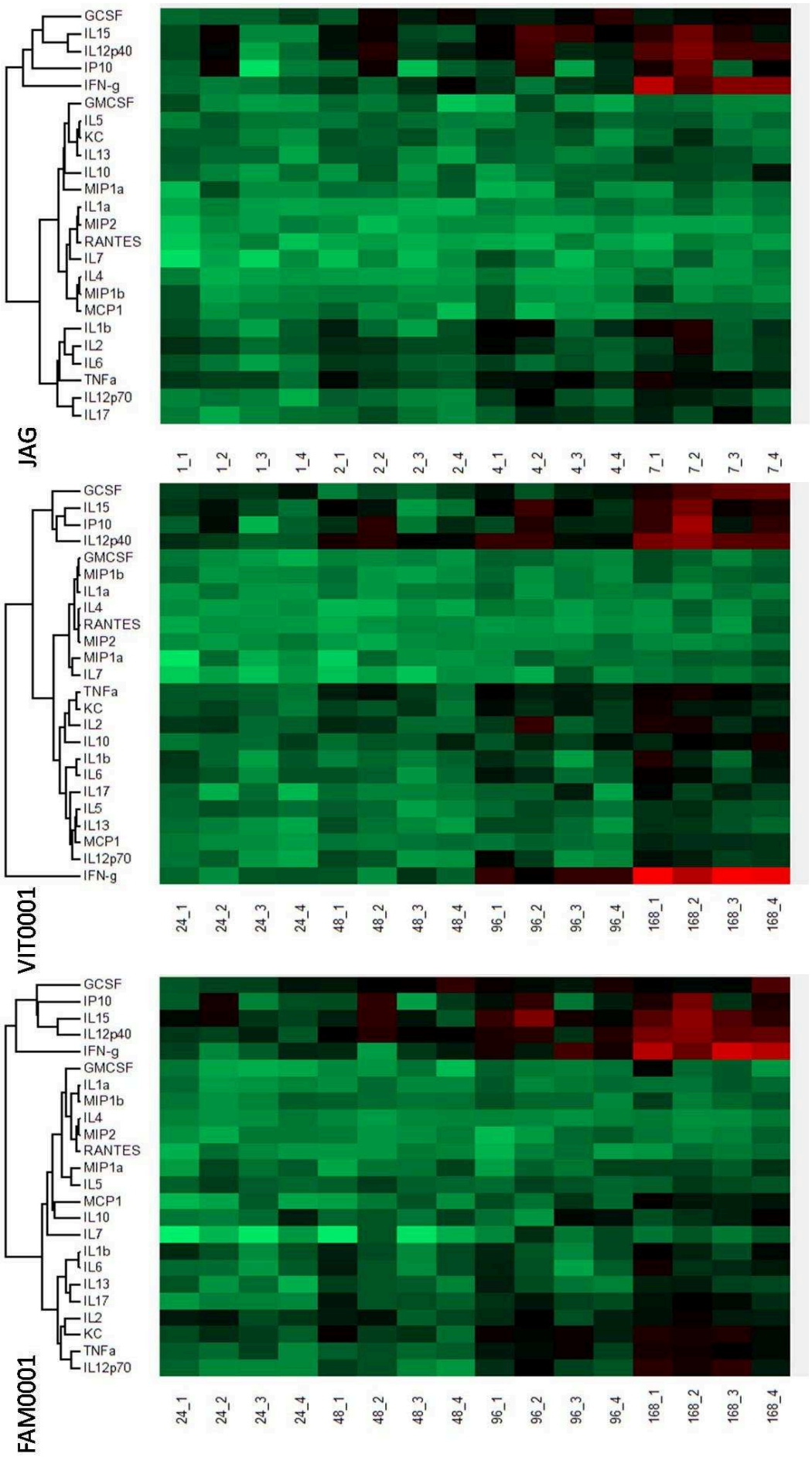
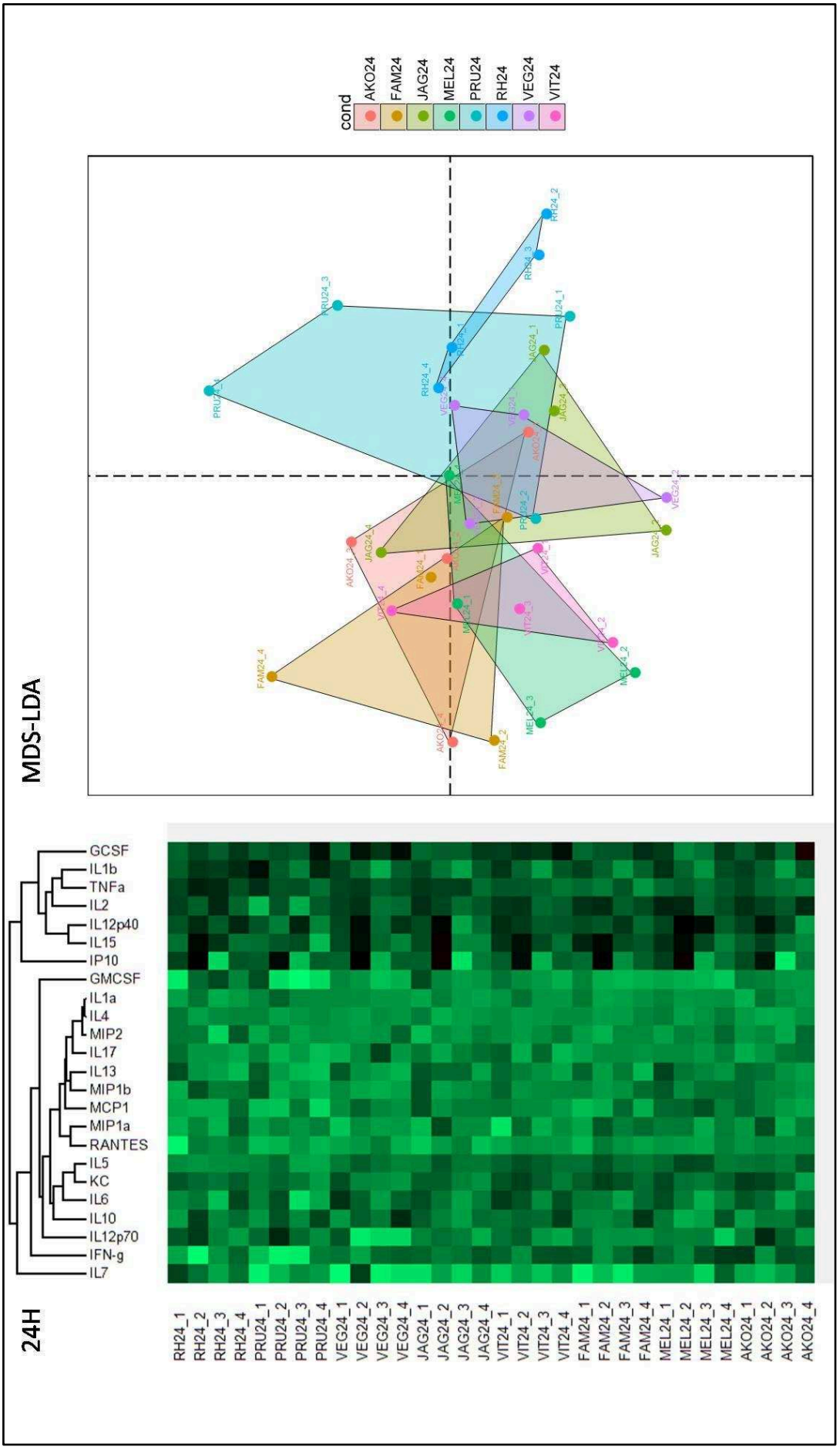
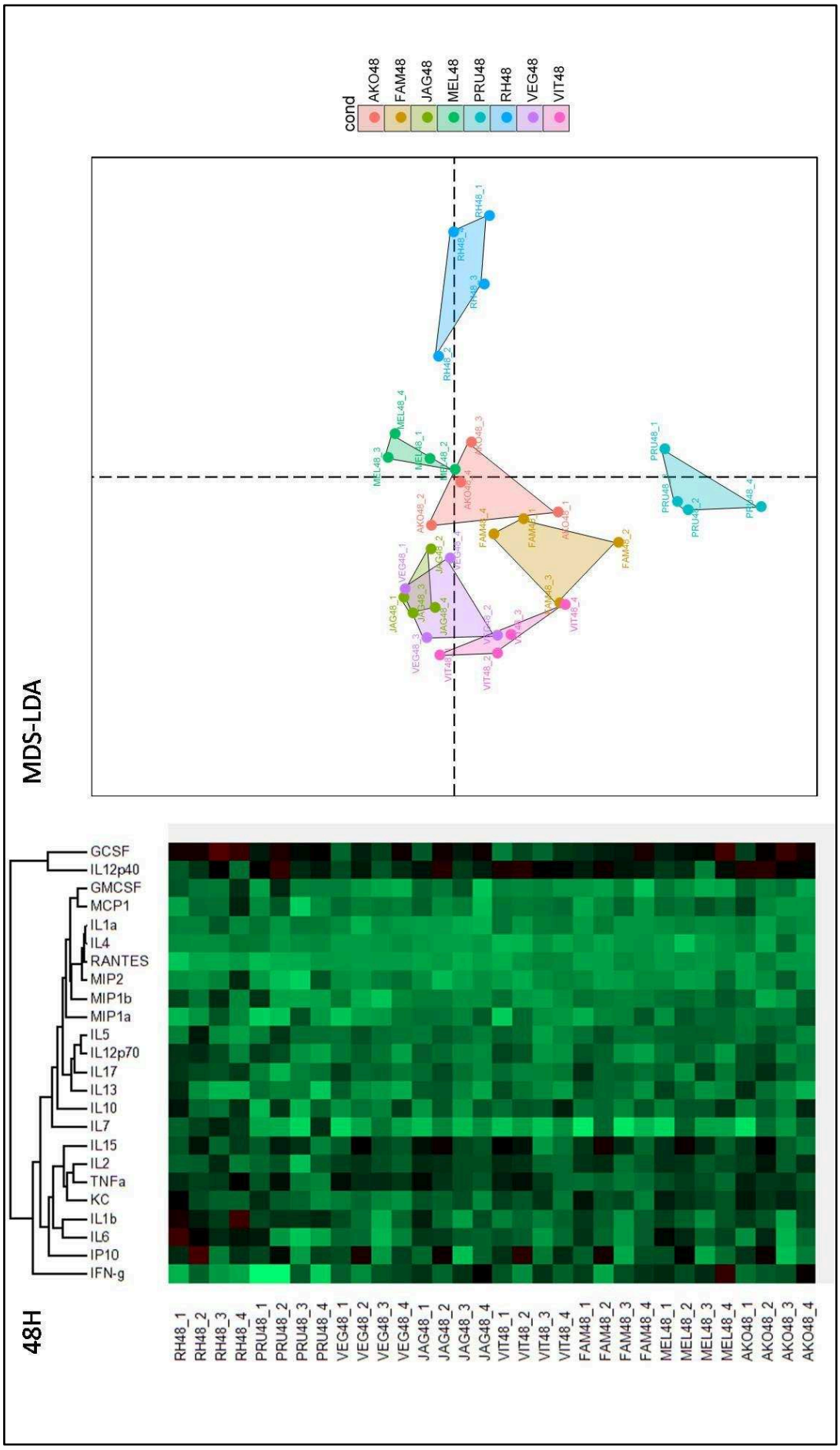
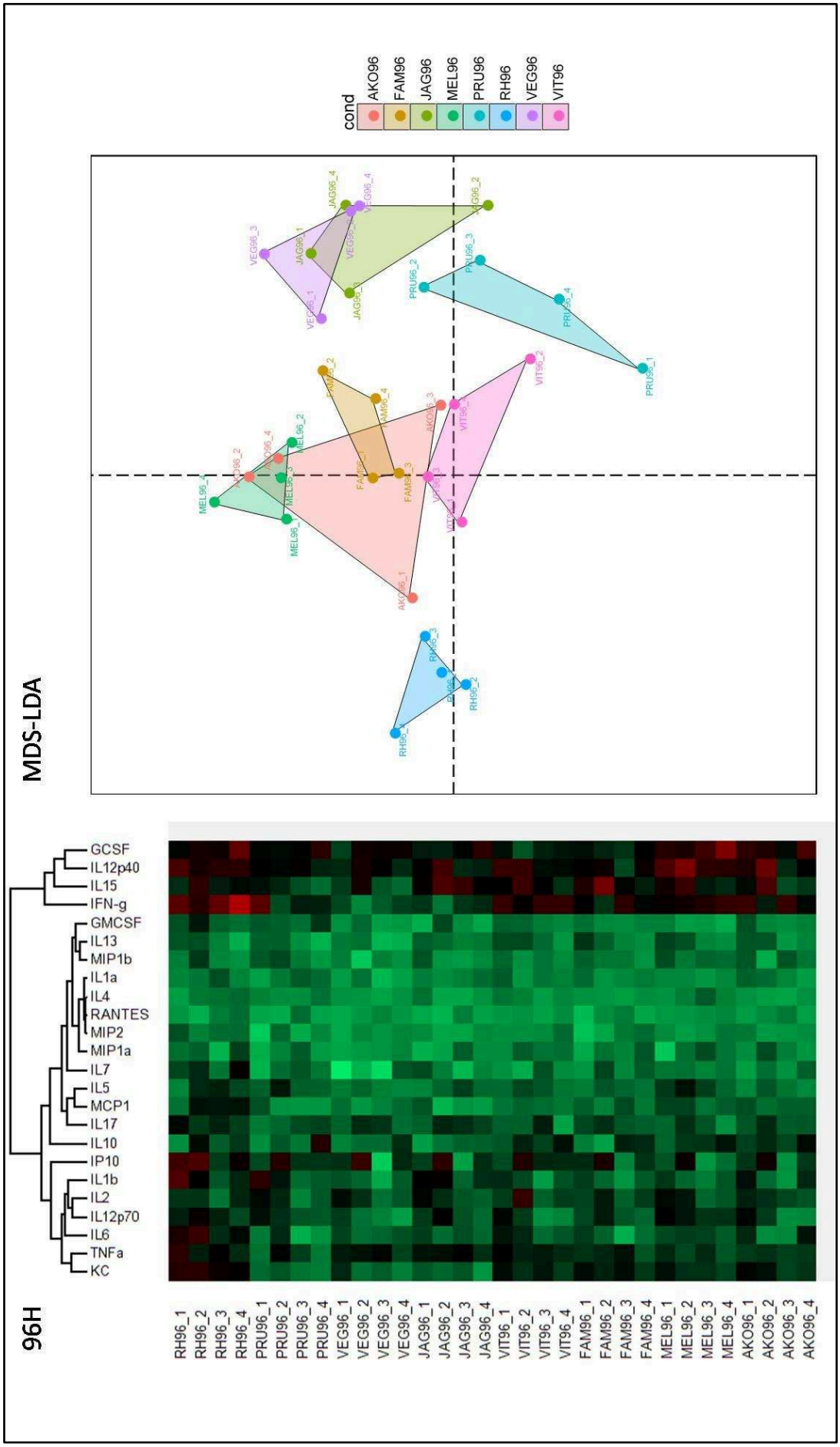


Figure 43 : Heatsmaps et Hierachical clustring générés avec le logiciel Perseus
Analyse réalisée à 24, 48, 96 et 168h post infection sur les 3 souches de références et les 5 souches guyanaises sélectionnées


MDS-LDA
cond
AKO24
FAM24
JAG24
MEL24
PRU24
RH24
VEG24
VIT24
24H
GCSF
IL1b
TNFa
IL2
IL12p40
IL15
IP10
GMCSF
IL1a
IL4
MIP2
IL17
IL13
MIP1b
MCP1
MIP1a
RANTES
IL5
KC
IL6
IL10
IL12p70
IFN-g
IL7
RH24_1
RH24_2
RH24_3
RH24_4
PRU24_1
PRU24_2
PRU24_3
PRU24_4
VEG24_1
VEG24_2
VEG24_3
VEG24_4
JAG24_1
JAG24_2
JAG24_3
JAG24_4
VIT24_1
VIT24_2
VIT24_3
VIT24_4
FAM24_1
FAM24_2
FAM24_3
FAM24_4
MEL24_1
MEL24_2
MEL24_3
MEL24_4
AKO24_1
AKO24_2
AKO24_3
AKO24_4


MDS-LDA
cond
AKO48
FAM48
JAG48
MEL48
PRU48
RH48
VEG48
VIT48
48H
GCSF
IL12p40
GMCSF
MCP1
IL1a
IL4
RANTES
MIP2
MIP1b
MIP1a
IL5
IL12p70
IL17
IL13
IL10
IL7
IL15
IL2
TNFa
KC
IL1b
IL6
IP10
IFN-g
RH48_1
RH48_2
RH48_3
RH48_4
PRU48_1
PRU48_2
PRU48_3
PRU48_4
VEG48_1
VEG48_2
VEG48_3
VEG48_4
JAG48_1
JAG48_2
JAG48_3
JAG48_4
VIT48_1
VIT48_2
VIT48_3
VIT48_4
FAM48_1
FAM48_2
FAM48_3
FAM48_4
MEL48_1
MEL48_2
MEL48_3
MEL48_4
AKO48_1
AKO48_2
AKO48_3
AKO48_4


MDS-LDA
cond
AKO96
FAM96
JAG96
MEL96
PRU96
RH96
VEG96
VIT96
96H
GCSF
IL12p40
IL15
IFN-g
GMCSF
IL13
MIP1b
IL1a
IL4
RANTES
MIP2
MIP1a
IL7
IL5
MCP1
IL17
IL10
IP10
IL1b
IL2
IL12p70
IL6
TNFa
KC
RH96_1
RH96_2
RH96_3
RH96_4
PRU96_1
PRU96_2
PRU96_3
PRU96_4
VEG96_1
VEG96_2
VEG96_3
VEG96_4
JAG96_1
JAG96_2
JAG96_3
JAG96_4
VIT96_1
VIT96_2
VIT96_3
VIT96_4
FAM96_1
FAM96_2
FAM96_3
FAM96_4
MEL96_1
MEL96_2
MEL96_3
MEL96_4
AKO96_1
AKO96_2
AKO96_3
AKO96_4

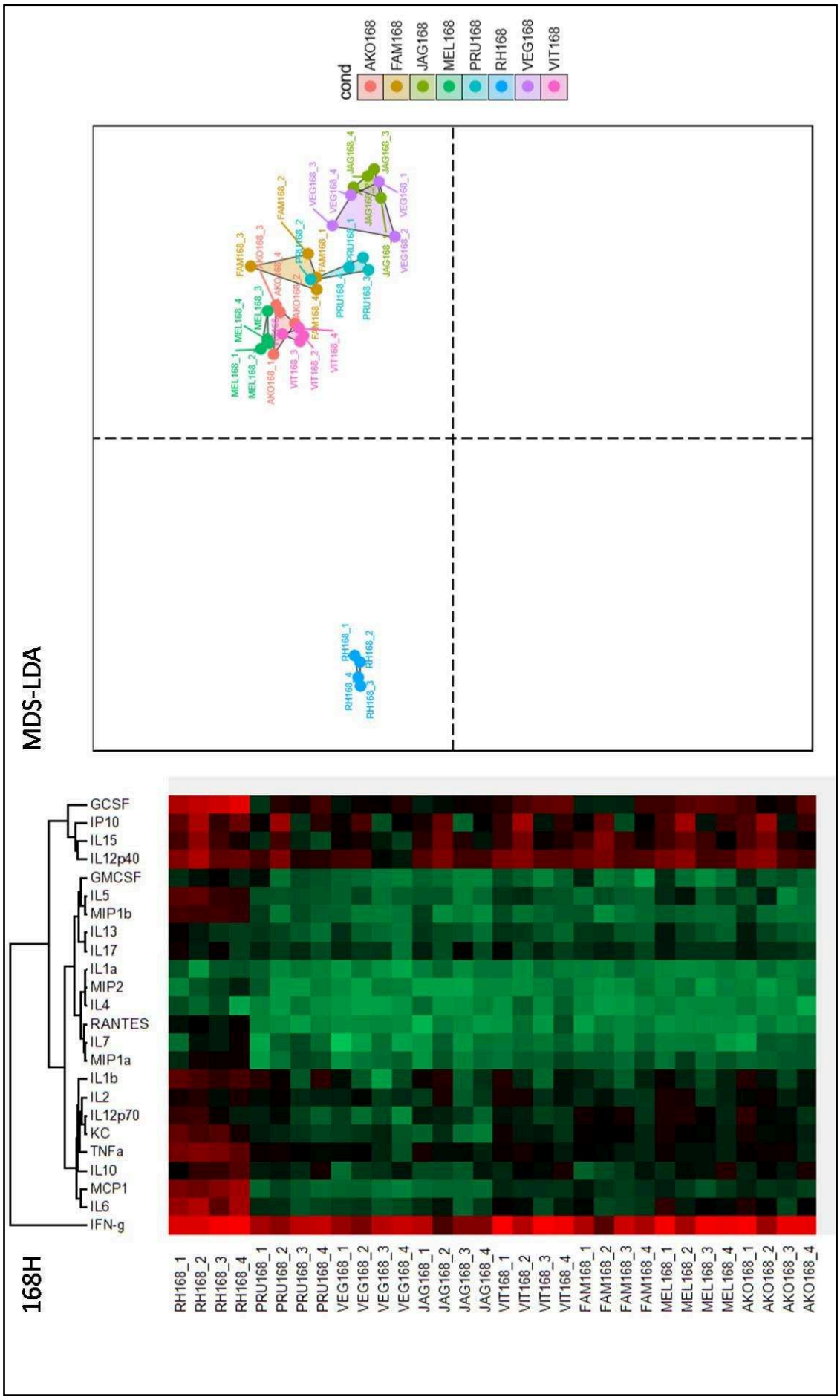


Figure 44 : Analyse par MDS-LDA sous R sur les 8 souches sélectionnées
Analyse à 24, 48, 96 et 168h post infection sur les 3 souches de référence et les 5 souches guyanaises sélectionnées.

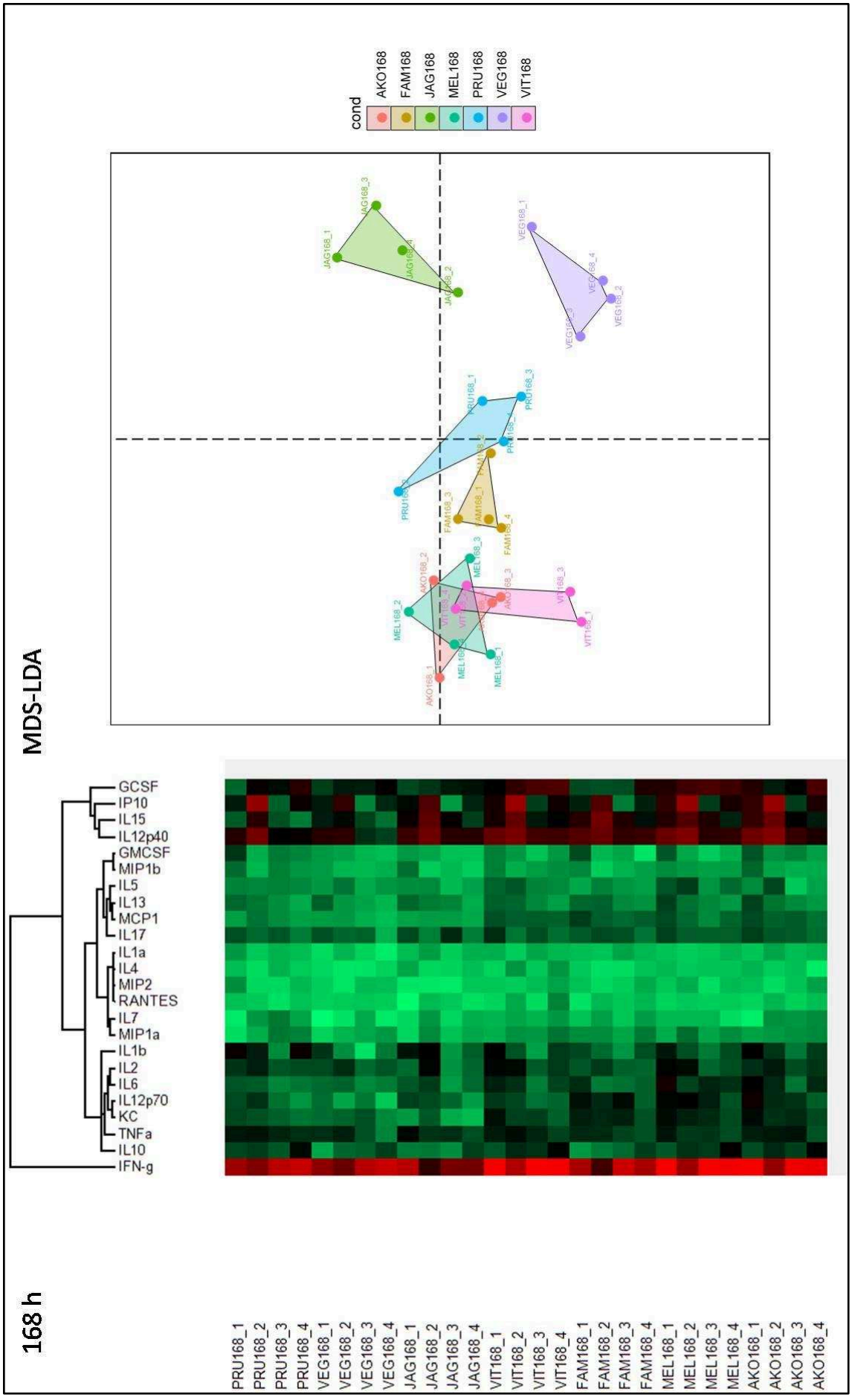


Figure 45 : Analyse par MDS-LDA sous R à 168h. sans la souche RH
Analyse à 168h avec 2 souches de référence (PRU et VEG) et les 5 souches guyanaises sélectionnées.

III. DISCUSSION GLOBALE

La toxoplasmose amazonienne est une illustration véritable du processus infectieux mettant en exergue le concept du « triangle disease » en rapport avec les relations entre l'hôte, le pathogène et l'environnement (Scholthof 2007). En effet, cette parasitose cosmopolite était jusque-là considérée comme bénigne dans la grande majorité des cas en Europe et en Amérique du Nord, où l'essentiel des souches isolées comprenait 3 lignées principales (Type I, II et III) (Howe and Sibley 1995). Des études génétiques suggèrent qu'il y a environ 1,5 millions d'années, les souches de T. gondii que nous connaissons actuellement, ont évolué à partir d'une souche commune ancestrale (Bertranpetit et al. 2017; Khan et al. 2007).

La description récente et de plus en plus fréquente (Sepulveda-Arias et al. 2014) de souches non issues des lignées clonales, considérées comme 'atypiques' et impliquées dans des processus pathologiques (Dubey et al. 2011b; Khan et al. 2011; Pomares et al. 2018) a réinterrogé sur l'effet souche et l'influence de l'environnement sur les mécanismes physiopathologiques des pathologies. En effet, la grande diversité génétique des souches circulant en Amérique du Sud avec la prédominance de souches atypiques semble liée à une haute pathogénicité notamment chez l'homme (Elbez-Rubinstein et al. 2009; Pomares et al. 2011). En Guyane française, la toxoplasmose amazonienne est l'exemple marquant de cette particularité clinique très probablement soutenue par des souches atypiques (Carme et al. 2009, Demar et al. 2012, Blaizot et al. 2018). Et si beaucoup d'études d'expérimentales ont été effectuées sur les souches clonales (Jensen et al. 2015; Ramaprasad at al. 2015; Sanfelice et al. 2017; Xu et al. 2018), à ce jour, très peu d'études ont été réalisées sur les souches amazoniennes et il paraissait pertinent d'analyser les mécanismes physiopathologiques sous-tendant cette probable virulence.

Le but de cette étude était d'analyser des souches de T. gondii humaines et animales, isolées en Guyane d'un point de vue :

- in vivo : quel est le réel pouvoir pathogène de ces souches dans le modèle murin ?
- génétique : est ce que cette virulence est liée au patrimoine génétique de ces souches ?
- immunologique : comment réagit l'hôte à une infection par une souche de T. gondii 'atypique' ?

Virulence souris

De façon générale, nous avons privilégié pour la sélection des souches, le critère clinique avec le gradient de sévérité et le biotope. En effet, la diversité des souches humaines étant répartie uniformément sur le territoire, nous avons choisi de travailler sur des souches ayant un intérêt clinique certain (Carme et al. 2009, Demar et al. 2012, Blaizot et al. 2018). Toutes les souches humaines impliquées dans la toxoplasmose amazonienne relèvent du biotope forestier. Nous n'avons que très peu sélectionné sur le critère géographie des souches, ce qui peut expliquer un échantillonnage de souches d'aspect très inhomogène, sans souches humaines en provenance de l'intérieur et de l'est du territoire. Concernant les souches animales, la récupération de souches de T. gondii à partir de la faune sauvage est difficile sur le plan de la logistique à mettre en œuvre et passe nécessairement par l'inoculation du parasite encore vivant aux souris à partir de tissus frais et « propres ». Ceci explique la rareté des souches provenant d'animaux sauvages ou d'endroits d'accès difficiles. Dans ce contexte, il nous paraissait nécessaire de tester l'unique souche de félidé isolée en Guyane (JAG) de même qu'une autre souche issue de la faune sauvage (VIT0001). Les 3 autres souches ont été isolées à partir d'animaux domestiques (chiens) vivant dans un milieu anthropisé : 2 proches géographiquement mais avec des génotypes «caribéen» différents et une ayant un génotype «amazonien».

Afin de mieux définir certaines caractéristiques de ces souches, nous les avons comparée avec des souches de référence étudiées dans diverses études in vivo publiées dans la littérature (Sibley and Boothroyd 1992; Howe and Sibley 1995; Saraf et al. 2017). Comme nous l'avons vu, bien que les résultats de DL_{99} pour les type II et III divergent, du fait du calcul mathématique de la détermination de la DL_{99}. Cependant, l'expérimentation animale a

conforté les résultats connus de la littérature quant à la différence et catégorisation de la virulence des souches de référence chez la souris notamment la virulence bien caractérisée de RH (type I). Ils ont également montré que les souches amazoniennes présentent une virulence comparable à la souche RH.

L'analyse par PCR temps réel du cœur des souris infectées a montré une quantité importante de tachyzoïtes lors de la mort notamment aves la souche RH et les souches guyanaises. De même qu'une multiplication moindre comme dans les souches de type II et III engendre moins de mortalité chez les souris infectées. L'analyse sur la quantification tissulaire des tachyzoïtes montre que la vitesse de multiplication des souches virulentes parait corrélée à la virulence observée chez la souris (Mordue et al. 2001).

Le score de virulence calculé nous a permis de mieux caractériser la virulence des souches et de les classer par rapport aux souches de référence, les unes par rapport aux autres et également par rapport à leur profil génétique. Les souches guyanaises ont un score relativement haut en comparaison des souches de référence. Pour les souches humaines, nous n'avons malheureusement pas pu démontrer une corrélation entre ce score et le degré de gravité du tableau clinique, vu que la souche impliquée dans le décès du patient présentait un des scores de virulence le plus bas. Cette hypothèse de corrélation entre le score de virulence et le degré de gravité de la maladie mériterait d'être validée dans des études expérimentales ultérieures sur un plus grand nombre de souches, ce qui permettrait de valider un outil d'évaluation de la virulence de T. gondii dans le modèle souris. Pour les souches animales, le score de virulence est variable en fonction de l'hôte mais reste relativement élevé par rapport à PRU ou VEG, ce qui suggère une certaine virulence des souches. La corrélation entre de telles souches et les présentations cliniques chez un patient contaminé n'a pas pu se faire vu qu'aucune souche de ce type n'a encore été isolée.

De façon générale, beaucoup d'essais expérimentaux étayant des hypothèses sur la virulence toxoplasmique ont été menés, basés sur des comparaisons générales entre différentes souches génotypiques, y compris les souches de référence clonales (Dubey et al. 2013; Zhang et al. 2016; Vilares et al. 2017) D'autres études ont abordé l'approche virulence expérimentale de T. gondii sous différents angles spécifiques comme i) l'étude de la corrélation entre la présentation clinique et les marqueurs biologiques de toxoplasmose aigüe, chronique ou secondaire impliquant les souches européennes ou américaines (Jensen et al. 2015) ou ii) la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques de base de T. gondii en

utilisant des souris transgéniques (Seng et at al. 2000; Dubey et al. 2012b) ou d'autres technologies avancées, comme l'imagerie par bioluminescence (Saeij et al. 2005; Avci et al. 2018).

Récemment, Pooja Saraf et al. (Saraf et al. 2017) ont proposé une méthodologie normalisée pour les études futures afin de permettre une analyse plus efficace et efficiente des modèles de génétique et de virulence pour T. gondii. Jusque là, très peu d'études avaient focalisé sur le modèle virulence souris et ce travail expérimental, relativement innovant et original rentre dans ce cadre.

Séquençage et analyse transcriptomique

Le séquençage des microsatellites a confirmé une grande diversité génétique des souches de Guyane, alors même pour des souches présentant une forte proximité géographique (FAM0001 et FAM0002). Cette biodiversité génétique est décrite depuis plusieurs années et a redonné un intérêt certain à la toxoplasmose (Al-Kappany et al. 2010; Markovic et al. 2014; Pomares et al. 2018; Wang et al. 2013a). Elle a été, en effet, un des indicateurs de critères de virulence vu qu'elle a été associée à des formes cliniques particulières et sévères (Demar et al. 2012; Pott and Castelo 2013; Blaizot et al. 2018). Le séquençage des gènes liés à la virulence a également montré une certaine divergence au niveau de l'homologie chez certain de ces gènes, notamment pour ROP18 qui a souvent été décrit comme le gène responsable de la virulence chez T. gondii (Behnke et al. 2015). Le remplacement de ce gène provenant d'une souche de forte virulente et transposé au génome d'une souche de virulence faible confirmait son positionnement en tant que gène responsable, la souche modifiée devenant beaucoup plus virulente (Behnke et al. 2015). Toutefois, dans notre étude, pour les souches comme FAM0001 et FAM0002 dont la virulence chez le modèle murin était plus proche de RH, les gènes de ROP18 étaient identiques à ceux de la souche VEG, de faible virulence. Il en est de même pour le gène ROP16 (Butcher et al. 2011) qui a une forte divergence chez PRU et JAG par rapport à RH. Cependant, la virulence de la souche JAG dans le modèle murin s'est révélée beaucoup plus importante que la souche PRU. Ces données laissent penser que d'autres facteurs que ceux connus et identifiés dans la littérature interviendraient dans la virulence des souches isolées de Guyane.

L'arbre phylogénétique a permis d'évoquer la présence d'un éventuel ancêtre commun entre les souches de Guyane et la RH mais aussi de clustériser certaines souches au regard du critère d'homologies génétiques telles que les souches JAG et PRU, FAM0001 /

FAM0002 et VEG. Ces homologies issues du séquençage de 13 microsatellites ainsi que de 8 gènes de virulence montrent bien que la variabilité et diversité génétique peut jouer sur un ensemble de gènes. Au cours de l'évolution, malgré le fait que ces souches aient un ancêtre commun, on note, pour certaines souches, l'atténuation voire la perte du pouvoir pathogène. Un pouvoir pathogène moins important pour l'hôte qui engendre donc moins de mortalité peut être une évolution pour T. gondii afin de faire émerger une souche capable d'infecter son hôte intermédiaire (rongeurs, oiseaux, …) sans le tuer (Müller and Howard. 2016). Il y a une plus grande possibilité que cet hôte intermédiaire rencontre un hôte définitif (félidés) loin de son lieu de contamination permettant ainsi une plus grande dissémination du parasite et entrainant une expansion clonale de T. gondii (Ajzenberg et al. 2004). Toutefois, une analyse phylogénétique sur un plus grand nombre de souches permettrait une vision plus représentative de la diversité génétique de T. gondii.

L'étude de l'expression des gènes a révélé que certains gènes n'étaient pas surexprimés par les souches de référence PRU et VEG. C'est notamment le cas pour le gène ROP18 qui, bien que présentant des divergences génétiques, est surexprimé chez les souches guyanaises ainsi que dans la souche RH. Ce résultat conforte le positionnement de ROP18 comme un des marqueurs de virulence de T. gondii (Behnke et al. 2015; Yamamoto et al. 2011). Cette étude a également montré lors de l'analyse des ARNm que l'expression de ces ARNm était plus précoce lors de l'infection de fibroblastes pour la majorité des souches guyanaises ainsi que pour la souche RH. Cette expression des ARNm chez les 3 souches animales (FAM0001, FAM0002 et JAG) est plus tardive comme pour les souches PRU et VEG.

L'analyse transcriptionnelle a montré que ces ARNm ne sont pas exprimés de la même façon. Ainsi, des gènes comme NTPase I et II (Olias and Sibley 2016; Luo et al. 2017), de la cyclophiline (Ibrahim et al. 2010; Ibrahim et al. 2015) ou de ROP5 (Etheridge et al. 2014; Reese et al. 2014) sont plus fortement exprimés dans la souche RH et les souches guyanaises par rapport aux 2 autres souches de référence. Ces gènes interviennent dans la virulence des souches au stade d'invasion des cellules hôtes, de dissémination du parasite ou formation de complexe maximisant l'efficacité de certaines kinases (ROP5-ROP18) (Behnke et al. 2015). Un typage épigénétique plus complet pourrait apporter plus de réponses sur les mécanismes de régulation des gènes.

Pour cette partie de l'étude, il s'agit de résultats préliminaires qui mériteraient d'être approfondis par des biostatisticiens afin de valider l'exploitation de cette carte puce à ADN.

Analyse immunologique

Le dernier point a été une analyse de la réponse immunitaire dans le modèle murin. Jusqu'à ce jour, aucune n'étude n'a exploré le profil immunologique des souches guyanaises et ne les a comparées aux profils immunologiques connus pour les souches dites de référence I, II, III (Filisetti and Candolfi 2004; Cai and Shen 2017; Zhen et al. 2017). Nous avons pour des raisons de coût sélectionné les souches à étudier en complément des souches de référence. Nous avons souhaité travailler avec des souches humaines (score de virulence élevé AKO et MEL) et des souches animales avec la souche d'hôte définitif (JAG), une souche avec un score de virulence élevé (VIT0001) et une souche avec un score de virulence intermédiaire (FAM0001). Il conviendra de conforter les résultats obtenus avec un plus grand nombre de souches tant humaines qu'animales. Les résultats obtenus quant au comportement des souches vis-à-vis des souches de référence ne sont pas corrélées avec les autres parties de l'étude (virulence sur modèle souris, séquençage et expression de gène de virulence). On note toutefois que les profils immunologiques des souches guyanaises restent atypiques au regard des profils déjà décrits dans la littérature pour les souches de référence (Filisetti and Candolfi 2004; Cai and Shen 2017; Zhen et al. 2017). De plus, si sur l'aspect comportement au niveau de la souris, séquençage des microsatellites et gènes de virulence, ces souches sont plutôt proches de RH, il n'en n'est rien pour le profil immunologique qu'elles induisent qui semblent plus similaires au profil de type PRU. Bien que nous n'ayons pu effectuer cette recherche sur l'ensemble des souches, les résultats que nous avons obtenus sont assez comparables pour les souches que nous avons testées. Des travaux complémentaires sur d'autres souches pourront étayer ces premiers résultats. Les dosages de ces cytokines – chemokines nous ont permis de constater que la souche RH provoquait, chez la souris, une augmentation importante de certaines de ces cytokines – chemokines comme l'IFN-g ou le TNF-a (Mordue et al. 2001; Iqbal et al. 2016), bien qu'elle soit plus modéré pour les souches de type II (Mordue et al. 2001) et III ainsi que pour les souches guyanaises.

L'analyse des heatmaps nous montrent que la souche RH présente un profil particulier avec une très forte réponse immunitaire et la constitution de 2 clusters distincts. Bien qu'il n'existe pas de données sur l'ensemble de des cytokines que nous avons testées, on retrouve toutefois des données sur la production de certaines cytokines comme l'IFN-γ, IL-12,

TNF-α, IL-1β et IL-10 dans le modèle murin (Mordue et al. 2001; Nguyen et al. 2003; Saeij et al. 2005) qui confortent nos résultats. Les souches guyanaises n'induisent qu'un seul cluster 'consensus' qui est également retrouvé pour les 2 souches de référence mais avec un taux plus faible. Les cytokines IL-12p40, l'IL-15 et l'IFN-γ interviennent dans la réponse immunitaire de type Th1. Cependant, on ne retrouve pas de production élevée d'IL-10. Cette interleukine est liée au contrôle de la réponse immunitaire de l'hôte mais aussi dans la production des lymphocytes B, responsable de la production d'anticorps. En effet, les dosages d'IgG et d'IgM effectués au niveau du laboratoire du Centre Hospitalier de Cayenne ont montré que dans les sérums des patients contaminés par une souche atypique, le seuil sérologique en IgG et IgM est plus élevé que pour des patients contaminés avec une autre souche. Il y a donc 2 hypothèses, soit une autre voie de production de ces anticorps est activée, soit le modèle murin a ses limites en ce qui concerne la transposition chez l'humain (Niedelman et al. 2012).

Enfin l'analyse MDS-LDA nous a confirmé le caractère 'exclusif' de la souche RH qui se démarque des autres souches tant en terme de production qu'en terme de nombre de cytokines activés. Une nouvelle analyse sans la souche RH permet de visualiser les profils immunologiques plus précis. Ainsi, le regroupement de MEL, AKO et VIT0001 conforte les résultats obtenus par rapport à la phylogénie et au score de virulence. On retrouve beaucoup de similitude entre ces souches en terme virulence, bien qu'elles n'ont pas été isolées de la même espèce (humain vs. grison) et n'ont pas le même génotype (Amazonien vs Caribéen intermédiaire).

Ce qui plus curieux, c'est l'éloignement de la souche JAG par rapport à MEL et AKO qui ont le même génotype (Amazonien). Bien que le cluster d'activation de cytokines soit le même, le taux de production est globalement plus faible que les autres souches. Cette éloignement se ressent également en phylogénie où la souche JAG à le même embranchement que la souche PRU. La souche JAG a également le score de virulence le plus faible de toutes les souches testées et la quantification par PCR temps réel sur les cœurs de souris donne des valeurs équivalentes à la souche PRU. La souche JAG a bien un comportement de souche virulente et est issue d'un biotope sauvage, cependant au niveau phylogénie et réponse immunitaire, elle serait plus proche d'un type II. Quels sont les mécanismes qui pourraient expliquer cette différence ? Y a-t-il eu une évolution particulière de cette souche ou y a-t-il eu une recombinaison avec une autre souche moins virulente ? Ce sont des questions auxquelles nous ne pouvons répondre mais qui méritent d'être explorer plus en profondeur par l'étude du génome (NGS) ou de l'expression de gène (RNA-seq). Il existe un lien entre la génétique et la

réponse immunitaire car si les protéines issues des gènes qui vont induire la réaction immunitaire sont mutées, leur pouvoir de réagir avec d'autres protéines peut être altéré, ce qui aura pour conséquence de diminuer l'activation de certaines voies, pouvant entrainant la diminution de la réponse immunitaire.

Pour plus de clarté dans la compréhension du document, une synthèse des résultats les plus significatifs a été compilée dans le tableau suivant (**Tableau 15**).

Tableau 15: Synthèse des résultats les plus significatifs

	RH	PRU	VEG	GUY-WAY-2007	GUY-GRO-2011	GUY-MEL-2013	GUY-AKO-2004	GUY-TOJ-2006	GUY-CAN-FAM0001	GUY-CAN-FAM0002	GUY-CAN-FAM0007	GUY –JAG-2004	GUY-GAL-VIT0001
Hôte				Humain	Humain	Humain	Humain	Humain	Chien	Chien	Chien	Jaguar	Grison
Symptomes cliniques				Fièvre, bronchite persistante	Fièvre, hépatite aiguë sévère	Fièvre, pneumopathie, cardiopathie,	Fièvre, anasarque, atteinte cardiaque (myocardite aiguë, péricardique…)	Fièvre, défaillance multiviscéral (cardiaque, rénal, neurologique)					
Sévérité clinique				Peu sévère	Sévère	Sévère	Très sévère	Très sévère					
Biotope				Sylvestre	Sylvestre	Sylvestre	Sylvestre	Sylvestre	Anthropisé	Anthropisé	Anthropisé	Sylvestre	Sylvestre
Génotype	Type I	Type II	Type III	Amazonien	Amazonien	Amazonien	Amazonien	Amazonien	Caribéen 1	Caribéen 2	Amazonien	Amazonien	Caribéen intermédiaire
DL_{50} - DL_{99}	1 - 4	3933 - 2.10^{13}	126273 - $1,5.10^{10}$	5 - 465	1 - 7	3 - 1018	3 - 327	2 - 745	8 - 561	7 - 217	4 - 12	10 - 182	2 - 9
Score prédictif de virulence	5,89	1,07	0,32	3,01	3,4	3,48	3,55	3,28	2,88	2,59	3,42	2,42	4,9
Phylogénie - Cluster 1	X			X	X	X	X	X			X		X
Phylogénie - Cluster 2		X										X	
Phylogénie - Cluster 3			X						X	X			
Ratio 26S>28S	<48h.	>72h.	>96h.	<72h.	<72h.	<72h.	<72h.	<72h.	>72h.	>72h.	<72h.	>72h.	<72h.
Surexpression (Maximum d'intensité)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (t=48h.) SAG3 (t=96h.) ROP38 (t=96h.)	SAG1 (t=72h.) SAG3 (t=120h.)	SAG1 (t=96h.) SAG3 (t=96h.)	SAG1(t=72h.) ROP18 (t=72h.) SAG3 (t=96h.) GRA3 (t=120h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=96h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=96h.) GRA3 (t=120h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=72h.) GRA3 (t=96h.) MIC1 (t=72h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=96h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=96h.) GRA3 (t=120h.) MIC1 (t=96h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=96h.) GRA3 (t=96h.) ROP38 (t=96h.) MIC1 (t=120)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=96h.) MIC1 (t=96h.) GRA3 (t=96h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (t=72h.) SAG3 (t=96h.)	SAG1 (t=72h.) ROP18 (72h.) SAG3 (t=96h.)
Taux d'expression (RH vs. souche)													
ROP18		2,7	75,7	-1,1	-1,7	2,4	-2,1	2,4	180,9	169,4	2	2,9	2,3
ROP16		2,9	7,2	-1,7	-1,3	1,9	-1,3	2,9	1	1,7	3	1,9	3,9
NTPase I		4,1	12,2	-1,2	-1,1	2,7	-1,3	3,3	1,1	4,6	2,4	4,8	3,5
NTPase II		6,9	20,5	-1,3	-1,1	3,9	-1,5	5,3	1,3	7,2	4,6	7,3	4,8
Cyclophiline		4,7	11,2	2,6	2,1	2,7	2	3,8	2,1	2,7	2,1	3	6,2
ROP5		5,6	9,3	1,6	1,5	1,4	1,2	4,2	1,3	2,2	1,4	7,9	5,2
GRA7		2,6	7	-1,6	-1,1	2,6	-1,7	2,2	-1,1	1,7	1,8	1,9	2,6
Gène 42. m03509 (calmodulin-like)		2,4	5,7	-7,5	-1,5	1,4	-3,8	1,5	-2,3	1,7	2,7	2,6	1,9

	RH	PRU	VEG	GUY-WAY-2007	GUY-GRO-2011	GUY-MEL-2013	GUY-AKO-2004	GUY-TOJ-2006	GUY-CAN-FAM0001	GUY-CAN-FAM0002	GUY-CAN-FAM0007	GUY –JAG-2004	GUY-GAL-VIT0001
Clusters immunologiques													
IFN-γ	X	X	X			X	X		X			X	X
IL12p40	X	X	X			X	X		X			X	X
KC	X												
IL-15	X	X	X			X	X		X			X	X
TNF-α	X	X	X										
IL1β	X												
IP10	X												
IL-6	X												
GCSF	X	X	X			X	X		X			X	X
MIP1β	X												
IL-10	X												
IL-5	X												
IL-17	X												
IL12p70	X	X											
IL-7	X												
IL-2	X	X	X										
IP10		X											
IL1β		X											
IL-10		X	X			X	X		X			X	X

En conclusion, au décours de cette étude expérimentale, l'hypothèse d'une virulence particulière des souches isolées en Guyane française semblent être confortées notamment une virulence des souches atypiques circulant plus proche de la celle rapportée pour la souche RH que du celle du type II très fréquemment isolées en Amérique du Nord et Europe (Howe and Sibley 1995). Bien que le modèle murin soit assez éloigné du modèle humain (Niedelman et al. 2012), il nous fournit de précieux renseignements sur le comportement de ces souches chez son hôte et nous autorise à évoquer la corrélation entre le génotype des souches, la présentation clinique et le biotope environnemental en accord avec le « triangle disease » (Scholthof 2007). Une multiplication et une dissémination rapide à travers l'organisme de l'hôte semble être une des clés de la virulence de ces souches. Cet aspect mérite de poursuivre les expérimentations pour préciser les mécanismes impliqués.

Au niveau génétique, ces souches ont une grande variabilité, que ce soit au niveau de microsatellites ou au niveau de gènes codant. Certaines souches sont issues d'une lignée ayant un ancêtre commun avec la souche RH, tandis que d'autres ont un ancêtre commun avec les souches de virulence plus faible PRU et VEG. Le gène ROP18 est particulièrement intéressant car il est décrit comme un des principaux responsables de la virulence. Cependant, ce qui est curieux, c'est d'avoir un gène codant pour ROP18 qui soit 'originel' (RH) et un autre qui soit fortement muté (FAM0001-FAM0002) et que malgré ce gène muté, ces souches conservent une virulence élevée. De plus, la quantité produite de ce ROP18 muté lors de l'infection est beaucoup plus faible que pour la forme présente dans RH. Il s'avère que l'analyse transcriptionnelle a révélé d'autres gènes susceptibles d'être à l'origine de la virulence des souches guyanaises tels que la NTPase I et II, la cyclophiline ou ROP5 qui sont plus fortement exprimés que dans les souches de référence PRU et VEG. Ces données doivent être confortées par d'autres études protéomiques, mais aussi in vivo.

La réponse immunitaire de l'hôte face à l'infection par les souches guyanaises est de type activation de la voie Th1. Cependant, au regard de la souche RH, d'autres mécanismes peuvent être évoqué dans le processus de virulence car cette réponse ne semble pas correspondre au comportement in vivo sur la souris

Toutes ces données tendent à prouver que la virulence de ces souches ne repose pas sur un seul facteur mais que cela soit un ensemble de plusieurs facteurs combinés (génétiques, immunologique, environnementaux) qui permet à ces souches d'avoir un tel pouvoir pathogène.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au décours de cette étude, les souches guyanaises impliquées dans la toxoplasmose en Guyane française sont un peu mieux connues sur le plan du comportement in vivo chez la souris ainsi que sur leurs profils immunitaires. Si ces souches semblent relativement proches de la souche RH en termes de virulence souris, séquençage des gènes microsatellites et gènes connus de résistance (ROP, MIC), un très grand nombre de questions persistent toutefois notamment sur les mécanismes immunologiques qui sous-tendent cette virulence. En effet, il semble que leur profil est plus proche de la souche avirulente PRU avec toutefois des seuils plus élevés de production de cytokines.

Selon Minot (Minot et al., 2012), la virulence de T. gondii semble dépendre de facteurs liés à l'interaction parasite-cellule-hôte et dans la réponse immunitaire de l'hôte. Il semble que les variations génétiques entre les souches déterminent les différences de virulence, la modulation des voies de signalisation de l'hôte, la multiplication et la dissémination parasitaire, ainsi que la sévérité de la maladie chez la souris et très probablement chez l'homme. Ce sont ces différents éléments et différentes approches que nous avons voulu aborder dans ce document.

Au vu des résultats qui restent préliminaires pour un certain nombre d'entre eux, il conviendra de conforter les données acquises lors de cette thèse en utilisant plus de souches à la fois humaines et animales, réparties de façon homogène sur le territoire guyanais.

Le score de virulence, outil plus précis pour la description de la virulence souris, semble bien corrélé au tableau clinique décrit lors d'infections par les souches humaines. Il doit être validé tant par les données cliniques humaines mais par le modèle murin. Concernant la virulence in vivo, des études similaires à celle réalisée dans cette thèse pourront être réalisée en utilisant un nombre plus restreint de souris (groupe de 5 au lieu de 10 souris) afin d'augmenter le nombre de souches à tester. Il faudrait alors en tenir compte lors du calcul car en réduisant le nombre de souris, on risque de diminuer la précision du score. Le classement des souches seraient alors plus délicat De même, au niveau de la phylogénie des souches et afin de définir les origines des souches, les divergences doivent être réalisées sur un plus grand nombre de souches, représentatives de la diversité des souches guyanaises. Malgré des divergences génétiques parfois importantes sur certains gènes, une certaine virulence de ces

souches demeure. Une étude plus approfondie sur l'ensemble du génome (NGS, RNA-seq) de ces souches de T. gondii pourrait apporter des réponses sur les différences génétiques des souches atypiques versus les souches moins virulentes.

D'autre part, l'analyse des cytokines-chemokines pourra être réalisée chez des patients ou chez des animaux infectés afin de vérifier la présence de ce cluster 'consensus' que l'on retrouve dans le modèle murin. L'hypothèse de mécanismes différents que ceux décrits dans l'infection par les souches classiques doit être confortée. Une analyse transcriptomique des cytokines à différents temps de l'infection pourra compléter cette étude et explorer les différents mécanismes qui sous-tendent la virulence des souches. Une autre piste d'étude est de pouvoir isoler le mécanisme qui permet la production des IgG et des IgM dont les taux détectés chez des patients infectés par des souches guyanaises sont très supérieurs aux taux détectés chez des patients infectés par des souches non virulentes.

Au total, cette thèse loin d'être une fin en soi est un recueil de données préliminaires qui contribuerait à fournir des pistes de recherche tant sur le modèle murin des souches guyanaises et leur virulence in vitro, que sur leurs origines et leur positionnement par rapport aux souches de référence et leur profil immunologique.

Plusieurs de ces données pourront être complétés par des études plus poussées, utilisant un plus grand nombre de souches humaines et animales, évoluant en milieu forestier et anthropisé et représentatives de la diversité génétique des souches guyanaises.

V. TRAVAUX SCIENTIFIQUES DURANT LA PERIODE DE THESE

ASSOCIES AU TRAVAIL DE THESE :

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- **Simon S**, De Thoisy B, Mercier A, Nacher M, Demar M. Virulence of atypical Toxoplasma gondii strains in a murine model. Parasite (Soumis)

- Khan A, Ajzenberg D, Mercier A, Demar M, **Simon S**, Darde ML, Rosenthal B, Verma S, Dubey J, Sibley LD. Geographic separation of domestic and wild strains of T. gondii in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosome 1a and enhanced transmission in the domestic cat. PLoSNegl Trop Dis.2014 Sep 18;8(9).

- Groh M, Faussart A, Villena I, Ajzenberg D, Carme B, Demar M, Joly V, Houze S, **Simon S**, Aubert A, Charlois-Ou C, Yeni P. Acute lung, heart, liver, and pancreatic involvements with hyponatremia and retinochoroiditis in a 33-year-old French Guiananpatient. PLoSNegl Trop Dis. 2012 October; 6(10):e1802

- Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, de Thoisy B, Bonnabau H, Collinet F, Boukhari R, Blanchet D, **Simon S**, Carme B, Dardé ML. Human impact on genetic diversity of Toxoplasma gondii: Example of the anthropized environment from French Guiana.Infect Genet Evol. 2011 Aug;11(6):1378-87.

COMMUNICATION ORALE

- **Simon S**, Demar M, Nacher M. Virulence of Toxoplasma gondii in French Guiana. Amazonian Conference on Emerging and Infectious Disease. Cayenne, French Guiana, September 26th to 28th 2014.

COMMUNICATION PAR POSTER

- **Simon S**, Demar M, De Thoisy B, Nacher M. Virulence et analyse phylogénétique des souches de Toxoplasma gondii en Guyane Française. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale. Bordeaux, France, 21 – 22 mai 2015.

- Demar M, Elenga N, **Simon S**, Djossou F, Carme C.Toxoplasmose amazonienne : une entité clinique particulière et problématique décrite en Guyane française. 4ème journées interrégionales de veille sanitaire des Antilles Guyane, octobre 2012 (Guadeloupe)

AUTRES PUBLICATIONS PENDANT LA PERIODE DE THESE

- **Simon S**, Nacher M, Carme B, Basurko C, Roger A, Adenis A, Ginouves M, Demar M, Couppié P. Cutaneous Leishmaniasis in French Guiana: Revising epidemiology with PCR-RFLP. Trop Med Health. 2017 Feb 28;45:5.

- Ginouvès M, **Simon S**, Nacher M, Demar M, Carme B, Couppié P, Prévot G. In Vitro Sensitivity of Cutaneous Leishmania Promastigote Isolates Circulating in French Guiana to a Set of Drugs. Am J Trop Med Hyg. 2017 May;96(5):1143-1150.

- Stefani A, Cheuret M, N'Guyen D, **Simon S**, Brousse P, Carme B, Nacher M. Interactions between Gastrointestinal Nematodes and Malaria in a Cohort of Children in an Amazonian Village. J Trop Pediatr 2016 Sep 30.

- Ajzenberg D, Lamaury I, Demar M, Vautrin C, Cabié A, **Simon S**, Nicolas M, Desbois-Nogard N, Boukhari R, Riahi H, Dardé ML, Massip P, Dupon M, Preux PM, Labrunie A, Boncoeur MP. Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of Toxoplasma gondii: A Prospective and Multicentric Study. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jun 29;10(6).

- Ginouvès M, **Simon S**, Bourreau E, Lacoste V, Ronet C, Couppié P, Nacher M, Demar M, Prévot G. Prevalence and distribution of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania parasites from French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2016 Jan 6;94(1):102-6

- Debourgogne A, Blanchet D, Fior A, Umhang G, **Simon S**, Aznar C. Neotropical echinococcosis caused by Echinococcus vogeli in a 6-year-old child: the second case report in humans in French Guiana. Paediatr Int Child Health. 2015 Sep 10:204.

- Martin-Blondel G, Iriart X, El Baidouri F, **Simon S**, Mills D, Demar M, Pistone T, Le Taillandier T, Malvy D, Gangneux J-P, Couppie P, Munckhof W, Marchou B, Ravel C, Berry A. Outbreak of Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis, Saül, French Guiana. Emerg Infec Dis. 2015 May;21(5):892-894.

- Darrigade A-S, Sambourg E, Duvignaud A, Sainte-Marie D, Labbé S, Renaux A, **Simon S**, Carme B, Demar M, Couppié P. Leishmanioses cutanéo-muqueuse en Guyane : prédominance de l'espèce Leishmania guyanensis. Ann Dermato Venereol 2014,141(12), S298.

- Blanchet D, Brenière SF, Schijman AG, Bisio M, **Simon S**, Véron V, Mayence C, Demar-Pierre M, Djossou F, Aznar C. First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. Infect Genet Evol. 2014 Dec;28:245-50.

- Sambourg E, Demar M, **Simon S**, Blanchet D, Dufour J, Sainte-Marie D, Fior A, Carme B, Aznar C, Couppié P. [Paracoccidioidomycosis of the external ear]. Ann Dermato Venereol, 2013,141(8-9):514-517.

- Roger A, Nacher M, Hanf M, Drogoul AS, Adenis A, Basurko C, Dufour J, Sainte Marie D, Blanchet D, **Simon S**, Carme B, Couppié P. Climate and leishmaniasis in French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2013 Sep;89(3):564-9.

- Moquet O, Blanchet D, **Simon S**, Veron V, Michel M, Aznar C. Histoplasma capsulatum in Cayenne, French Guiana. Mycopathologia. 2012 Oct;174(4):331-4.

- Couppié P, Abboud P, Blanchet D, Mahamat A, **Simon S**, Ajzenberg D, Dardé M-L, Carme B, Djossou F, Demar M. Toxoplasmose amazonienne: première observation décrite avec manifestations cutanéomuqueuses. Ann Dermato Venereol. 2012,139(12):B198.

VI. ANNEXES

VI. 1. Annexe 1 : Fiche technique des cellules HFF-1, ATCC® : SCRC-1041TM

ATCC

Product Sheet

HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Liquid nitrogen vapor phase

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium:

- fetal bovine serum to a final concentration of 15%

This medium is formulated for use with a 5% CO2 in air atmosphere. (Standard DMEM formulations contain 3.7 g/L sodium bicarbonate and a 10% CO2 in air atmosphere is then recommended).

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Organism: *Homo sapiens*, human
Tissue:
Skin; foreskin
Disease: Normal
Cell Type: Fibroblast
Age: Newborn
Gender: male
Morphology: fibroblast
Growth Properties: Adherent

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

It is not necessary to coat flasks with gelatin prior to plating cells, if tissue culture quality flasks are used. To insure the highest level of viability, be sure to warm media to 37°C before using it on the cells. Cells should be plated at a minimum cell density of $0.8X10^4$ cells/cm^2.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water.
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are half way thawed (approximately 90 seconds), and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial's contents plus 5 mL of complete growth medium to a 15 mL centrifuge tube. Use an additional 1 mL of media to rinse the vial and transfer the liquid to the 15 mL tube. Add 4 mL of complete growth media to bring the total volume to 10 mL.
4. Gently mix and pellet the cells by centrifugation @ 270 xg for 5 minutes.
5. Discard the supernatant and resuspend the cells with 10 mL fresh growth medium (warm) and plate the cells at seed density of $0.8 X10^4$ cells/cm^2.
6. Add more fresh growth medium (warm) to obtain the total volume recommended for the flask.
7. Incubate 37°C in a 5%CO_2 in air atmosphere.

Fluid change twice a week or when pH decreases. *It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).*

Subculturing Procedure

Procedure:
To insure the highest level of viability, be sure to warm media and Trypsin/ EDTA to 37°C before using it on the cells.

Cells should be split when they reach confluency. A split ratio of 1:5 to 1:7 is recommended. Volumes used in this protocol are for 225 cm^2 (T225); proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture flasks of other sizes.

1. Remove and discard culture medium.
2. Briefly rinse the cell layer with 1X PBS (SCRR-2201) solution to remove all traces of serum, which contain trypsin inhibitor.

ATCC

Product Sheet

HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Liquid nitrogen vapor phase

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium:

- fetal bovine serum to a final concentration of 15%

This medium is formulated for use with a 5% CO2 in air atmosphere. (Standard DMEM formulations contain 3.7 g/L sodium bicarbonate and a 10% CO2 in air atmosphere is then recommended).

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

3. Add 5 mL of Trypsin-EDTA (0.25% (w/v) Trypsin-0.53 mM EDTA solution, ATCC# 30-2101) solution to flask and incubate for 1 minute, gently tapping the flask observe cells under an inverted microscope until cells detach (usually within 1 to 2 minutes).
4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and rinse surface of the flask to detach all cells. Gently pipetting up and down will break cell clumps.
5. Transfer all cells into a centrifuge bottle or tube and centrifuge at 270 xg for 5 minutes.
6. Remove and discard the supernatant
7. Add 10 mL complete growth medium to cell pellet and with 10 mL pipette resuspend the cells gently (create a single-cell suspension).
8. Add more complete growth medium to cell suspension as needed to plate cells at approximately $5x10^6$/T225 flask.
9. Place flasks in incubator @ 37°C with a 5% CO_2 in air atmosphere.

Flask/Plate	Growth Area (cm^2)	1xPBS (mL)	Trypsin/EDTA (mL)	Equal vol. Complete Growth Medium (mL)	Growth Medium (mL)
T225	225	10 ± 0.2	6 ± 0.2	6 ± 0.2	30
75	75	5 ± 0.1	3 ± 0.1	3 ± 0. 1	12
T25	25	3 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	6
6 well	9.5	1 ± 0.1	1 ± 0.1	1 ± 0.1	3

Note: For more information on enzymatic dissociation and subculturing of cell lines consult Chapter 13 in *Culture of Animal Cells, a manual of Basic Technique* by R. Ian Freshney, 5th edition, published by Alan R. Liss, N.Y., 1994.
Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:5 to 1:7 is recommended
Medium Renewal: Twice a week or as pH decreases

Cryopreservation Medium

Complete growth medium supplemented with an additional 40% FBS and 10% (v/v) DMSO
Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.

Comments

The growth of these cells should be arrested before being used as a feeder layer. ATCC has successfully irradiated (SCRC-1041.1) and treated the cells with Mitomycin C (SCRC-1041.2) for use as a feeder layer. If the HFFs are being used as a feeder layer for ES cells, it is not recommended to use them past passage no. 50 (P50). It is recommended that the feeder cells be plated 24 hours before use at $5X10^4$ cells/cm^2 in order to obtain a supportive monolayer for stem cell growth.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

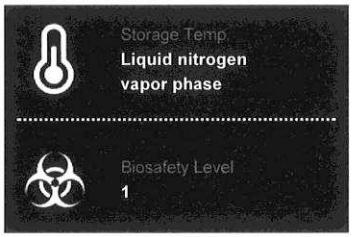
ATCC Warranty

ATCC

Product Sheet

HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium:

- fetal bovine serum to a final concentration of 15%

This medium is formulated for use with a 5% CO2 in air atmosphere. (Standard DMEM formulations contain 3.7 g/L sodium bicarbonate and a 10% CO2 in air atmosphere is then recommended).

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™)

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.
While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.
This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.
Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

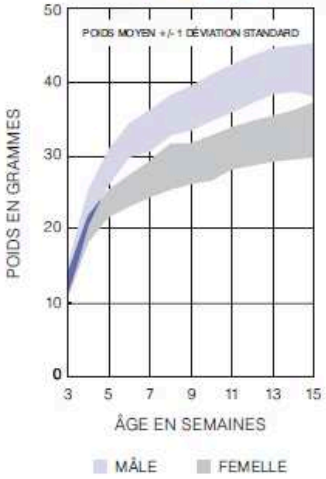
Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [05/08]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

VI. 2. Annexe 2 : Fiche technique des souris Swiss CD-1®



Souris CD-1® IGS

Apprendre Plus

CODE DE LA SOUCHE : 022

	MÂLE		FEMELLE	
Poids en grammes	Âge en jours*	Prix	Âge en jours*	Prix
Jusqu'à 12	Jusqu'à 21	4.95	Jusqu'à 22	4.95
13–15	22–23	5.35	23–25	5.35
16–18	24–27	5.55	26–30	5.55
19–21	28–31	5.70	31–37	5.70
22–24	32–38	5.85	38–49	5.85
25 et plus	Prix sur demande		Prix sur demande	
Anciens reproducteurs	–	5.35	–	5.35
Animaux d'une même portée de 21 jours seulement	–	6.65	–	6.65
Souris allaitante avec portée	–	–	–	65.10
Femelle gestante précisée	–	–	–	35.50
Femelle gestante non précisée	–	–	–	24.70

**Âge estimé*

Nomenclature Crl:CD1(ICR) **Origine** Le groupe d'origine de souris Swiss qui a servi de progéniteurs à cette souche consistait en deux mâles et sept femelles albinos dérivés à partir d'un stock non consanguin dans le laboratoire du Dr de Coulon, Centre Anticancéreux Romand, Lausanne, Suisse. Ces animaux furent importés aux États-Unis par le Dr Clara Lynch du Rockefeller Institute en 1926. La souche Hauschka Ha/ICR fut commencée en 1948 à l'Institute for Cancer Research (ICR) à Philadelphia à partir de souris « Swiss » d'origine Rockefeller. Au Dr Edward Mirand du Roswell Park Memorial Institute où ces souris furent appelées HaM/ICR. À Charles River en 1959. **Couleur de poils** Blanc (Albinos). **Application en recherche** Modèle général polyvalent, tests d'efficacité et d'innocuité, vieillissement, modèle de chirurgie, pseudogestationy

VI. 3. Annexe 3 : Amorces pour l'amplification des microsatellites

d'après (Ajzenberg et al. 2010)

Marqueurs de typage	TUB2	(F) 5' GTCCGGGTGTTCCTACAAAA 3'
		(R) 5' TTGGCCAAAGACGAAGTTGT 3'
	W35	(F) 5' GGTTCACTGGATCTTCTCCAA 3'
		(R) 5' AATGAACGTCGCTTGTTTCC 3'
	TgM-A	(F) 5' GGCGTCGACATGAGTTTCTC 3'
		(R) 5' TGGGCATGTAAATGTAGAGATG 3'
	B18	(F) 5' TGGTCTTCACCCTTTCATCC 3'
		(R) 5' AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA 3'
	B17	(F) 5' AACAGACACCCGATGCCTAC 3'
		(R) 5' GGCAACAGGAGGTAGAGGAG 3'
	M33	(F) 5' TACGCTTCGCATTGTACCAG 3'
		(R) 5' TCTTTCTCCCCTTCGCTCT 3'
	IV.1	(F) 5' GAAGTTCGGCCTGTTCCTC 3'
		(R) 5' TCTGCCTGGAAAAGGAAAGA 3'
	XI.1	(F) 5' GCGTGTGACGAGTTCTGAAAA 3'
		(R) 5' AAGTCCCCTGAAAAGCCAAT 3'
Marqueurs 'd'empreintes digitales'	M48	(F) 5' AACATGTCGCGTAAGATTCG 3'
		(R) 5' CTCTTCACTGAGCGCCTTTC 3'
	N60	(F) 5' GAATCGTCGAGGTGCTATCC 3'
		(R) 5' AACGGTTGACCTGTGGCGAGT 3'
	N82	(F) 5' TGCGTGCTTGTCAGAGTTC 3'
		(R) 5' GCGTCCTTGACATGCACAT 3'
	AA	(F) 5' GATGTCCGGTCAATTTTGCT 3'
		(R) 5' GACGGGAAGGACAGAAACAC 3'
	N83	(F) 5' ATGGGTGAACAGCGTAGACA 3'
		(R) 5' GCAGGACGAAGAGGATGAGA 3'

VI. 4. Annexe 4 : Amorces pour l'amplification des gènes de virulence

ROP16 (GenBank : GC249096)	(F) 5'-ATGAAAGTGACCACGAAAGGGC-3'
	(R) 5'-CTACATCCGATGTGAAGAAAGTTCGTA-3'
ROP18 (GenBank : JX045334)	(F) 5'-ATGTTTTCGGTACAGCGGCCA-3'
	(R) 5'-TTATTCTGTGTGGAGATGTTCCTGCTG-3'
ROP38 (GenBank : XM_002366710)	(F) 5'-ATGAAAAATACTCTGTTGTCACCTGTTG-3'
	(R) 5'-TCAAAATTGATGCGTTCTTATCCG-3'
GRA1 (GenBank : XM_002365660)	(F) 5'-CACTTGCTGTTGTTCTTTGAAGAAAT-3'
	(R) 5'-AAGTAACATGGGGTACGATCACAA-3'
GRA3 (GenBank : AF414079)	(F) 5'-AGTGAGGATCCTCTGCAAATCTTG-3'
	(R) 5'-ACCACGGGTGTCGCTTGA-3'
SAG1 (GenBank : JX045395)	(F) 5'-ATGTTTCCGAAGGCAGTGAGAC-3'
	(R) 5'-TCACGCGACACAAGCTGC-3'
SAG3 (GenBank : L21720)	(F) 5'-CGAGACTTCACGAGGGAGCTT-3'
	(R) 5'-TGTTAGACAAGACATTTAGGCAGCC-3'
MIC1 (GenBank : XM_002368490)	(F) 5'-ATGGGCCAGGCGTTGTTT-3'
	(R) 5'-TCAAGCAGAGACGGCCGTAG-3'

VI. 5. Annexe 5 : Amorces et sondes pour la détection de l'expression de gène

Actine Mouse (Applied Biosystems, ref : 4352933E)	(F) 5'-ACATCAAGGAGAAGCTTTGCTACA-3'
	(R) 5'-CTCAGCCGCCTTCATTTCC-3'
	(P) 5'-FAM-CGCCCTCGACTTC-MGB-NFQ-3'
GAPDH Mouse (Applied Biosystems, ref : 4352339E)	(F) 5'-TGGCCGACTCGTCTTTCG-3'
	(R) 5'-TGGGTGACCGCGACATC-3'
	(P) 5'-VIC-ATCGCCATGAGCAGAC-MGB-NFQ-3'
ROP16 (Butcher et al. 2011)	(F) 5'-AGGGGCAACCTTCTCAATCCA-3'
	(R) 5'-CCACCCAGCACCGAGACCTA-3'
	(P) 5'-FAM-ACTACAACCTGAACAAGCGGCGGCT-BHQ
ROP18 (Lei et al. 2014)	(F) 5'-CGGCCGACGGCATCT-3'
	(R) 5'-ACCAGCTCAGGCGTGGAA 3'
	(P) 5'-FAM-TTACACTTCGCAGATTGT-MGB-NFQ-3'
ROP38 (Peixoto et al. 2010)	(F) 5'-CCCGAGGAGCAGACTGTCA 3'
	(R) 5'-GCGGCTTGCCTCTGAATG 3'
	(P) 5'-FAM-CCTGCTTCAGGTAGCT-MGB-NFQ 3'
GRA1 (Carruthers and Sibley 1997)	(F) 5'-TCGAGCGCCGTCTCAGA 3'
	(R) 5'-CCTGTCCCTCCACTCAGCAA 3'
	(P) 5'-FAM CGGGCGTCTCTCT-MGB-NFQ 3'
GRA3 (Craver and Knoll 2007)	(F) 5'-GCTCCTGGACGCAATCGAT 3'
	(R) 5'-TCCCTCCGCCTGATTGTC 3'
	(P) 5'-FAM-CCGAGTCGGATAAGG-MGB-NFQ 3'
SAG1 (Rachinel et al. 2004)	(F) 5'-ACCTGCCCAGATAAAAAATCGA 3'
	(R) 5'-GTTTTAGGGCACTTGAGAGTGAAGT 3'
	(P) 5'-FAM-AGCCGCGGTCATTCTCACACCG-BHQ
SAG3 (Jacquet et al. 2001)	(F) 5'-TGGACCCGCAGAAGTGTTC 3'
	(R) 5'-CCACCACGAAGAGCTGTAGTCA 3'
	(P) 5'-FAM-CCTGACGAACATTTT-MGB-NFQ 3'
MIC1 (Cerede et al. 2005)	(F) 5'-TGTCCTGGCGGCGTACA 3'
	(R) 5'-CGACCCAATTTGGACAGTATCTCAT 3'
	(P) 5'-FAMCGGCAAAACAGTAATCACAGCAACGC-BHQ

VI. 6. Annexe 6 : Composition de la puce à ADN de T. gondii

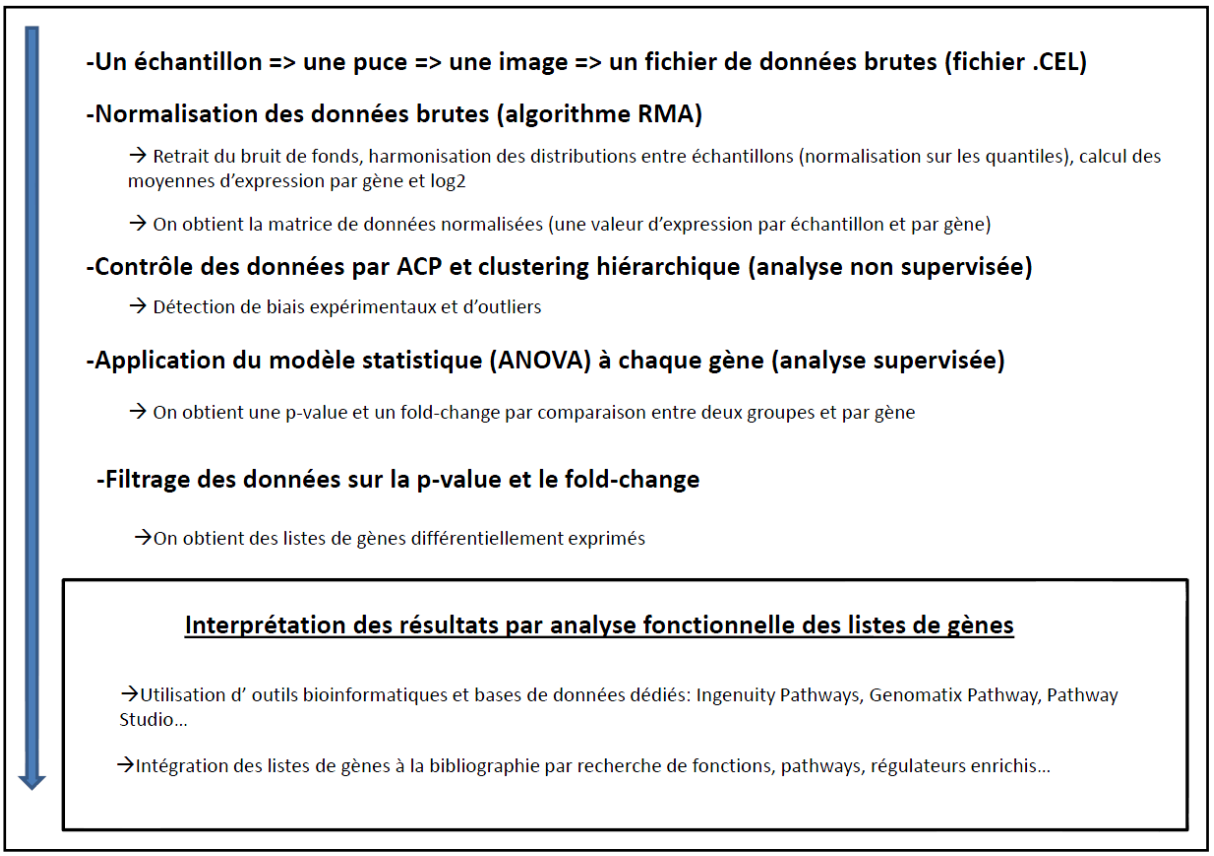
d'après (Bahl et al. 2010)

Application (for T. gondii unless otherwise indicated)	# of features	probes/ feature	Tilingde nsity	total # probes	% of chip
Expression Profiling					
nuclear coding genes (3' biased)[2]	8,058	11		88,638	39.12%
nuclear non-codinggenes	22	20		440	0.19%
apicoplastorganellargenome (nt)	34,997		25	1,4	0.62%
mitochondrial organellargenome (nt)	6,071		25	243	0.11%
all exons (chrIb only)[3]	1,08	6		6,48	2.86%
all introns (chrIb only)	1,08	5		5,4	2.38%
antisense probes (opposite CDS; chrIbonly)	227	20		4,54	2.00%
Gene Discovery					
ESTs without predicted gene models (nt)	830,867		35	23,739	10.48%
ORFs with BLASTX or TBLASTN hits (nt)	1,263,357		35	36,096	15.93%
Expression Profiling (host species)					
human (immune response&housekeeping)[4]	301	11		3,311	1.46%
mouse (immune response&housekeeping)[4]	291	11		3,201	1.41%
cat (housekeepinggenes)	12		30	360	0.16%
Genotyping					
T. gondii genetic markers	228	40		9,12	4.02%
SNPs inferred from T. gondii ESTs, etc	3,49	4		13,96	6.16%
P. falciparum genetic markers	1,985	4		7,94	3.50%
Other Analyses					
SFP discovery on 24 selected genes[5]	23,11		2	11,555	5.10%
promoters (for ChIP) on 12 selected genes[6]	12		10	1,2	0.53%
Controls					
commonlyusedtransgene reporters[7]	39	11		429	0.19%
human& mouse normalization probes				2,2	0.97%
yeast (housekeeping & spike-in probes)				839	0.37%
mismatch probes (genes on chr 1b)	227	11		2,497	1.10%
surrogatemismatch (background) probes				3	1.32%
TOTAL				226,588	100.00%

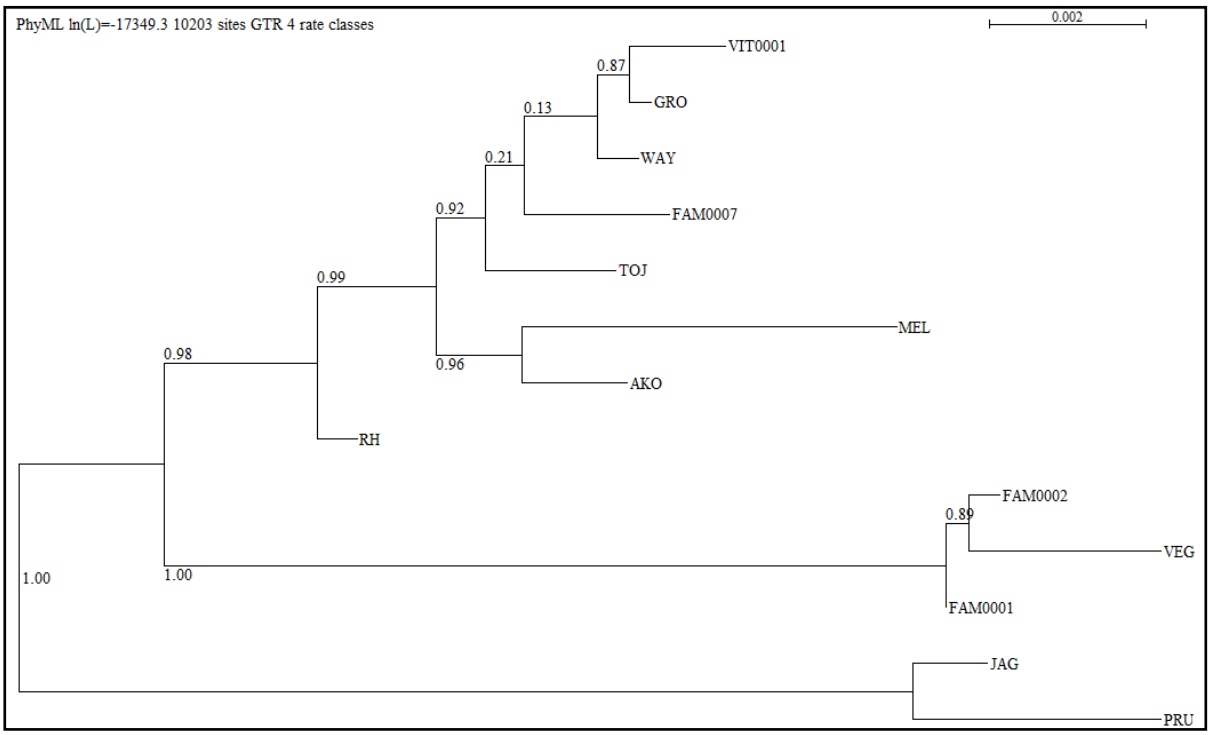
1 See http://ancillary.toxodb.org/docs/Array-Tutorial.html for a detailed description, including probe sequences.
2 A small minority of the 7,793 genes are represented by more than 1 probeset, differing in the degree to which they cross hybridize, while even fewer don't have named probesets of their own as they are interragated by probesets for other genes.
3 Non-terminal exons only (terminal exons are interrogated as part of 3'-biased profiling).
4 See http://ancillary.toxodb.org/docs/HostResponse.htm for details.
5 CDS for AMA1, B1, BSR4/R, GRA3/6/7, MIC2, ROP1/16, SAG1/2/3/4, SRS1/2/9; introns from ATUB, BTUB, BAG1, UPRT. See http://ancillary.toxodb.org/docs/SNPDiscovery.htm for details.

6 BAG1, BTUB, LDH1, LDH2, SAG1, SAG2, SAG2C, DHFR-TS, MIC2, GRA1, OWP1, OWP2; see http://ancillary.toxodb.org/docs/ChIP.htm.
7 For selectable drug-resistance markers, enzyme and fluorescent protein reporters, etc; see http://ancillary.toxodb.org/docs/TransgeneReporters.seq.

VI. 7. Annexe 7 : Résumé du traitement des données transcriptomiques des puces Affymetrix par la plate-forme Genom'ic



VI. 8. Annexe 8 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences des gènes de virulence et des microsatellites



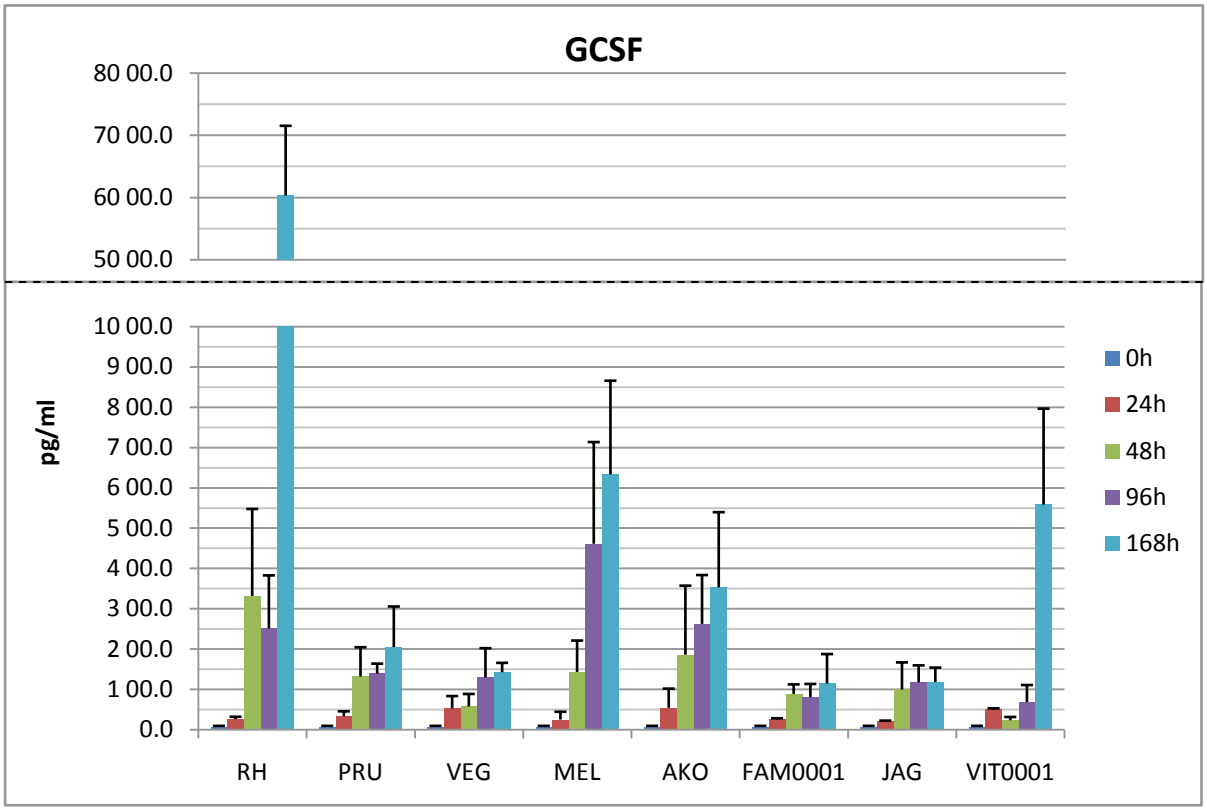
Méthode de maximum de vraisemblance avec le modèle GTR sur les séquences des 8 gènes de virulences et des 13 séquences des microsatellites concaténés.

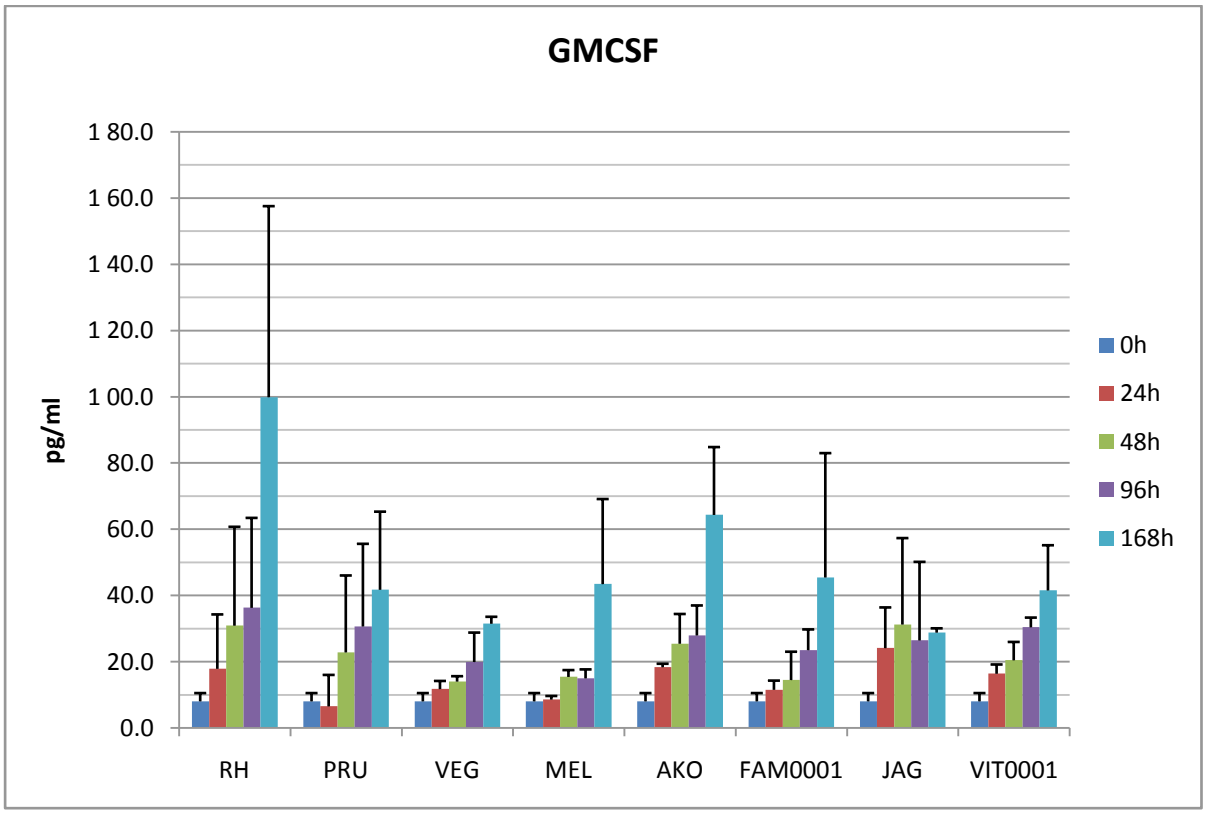
On retrouve des valeurs de bootstraps assez hautes (proche de 1), ce qui confirme une nouvelle fois la robustesse de l'arbre. L'aspect général des 2 arbres est resté le même. L'ajout des séquences microsatellites confirme le profil de l'arbre.

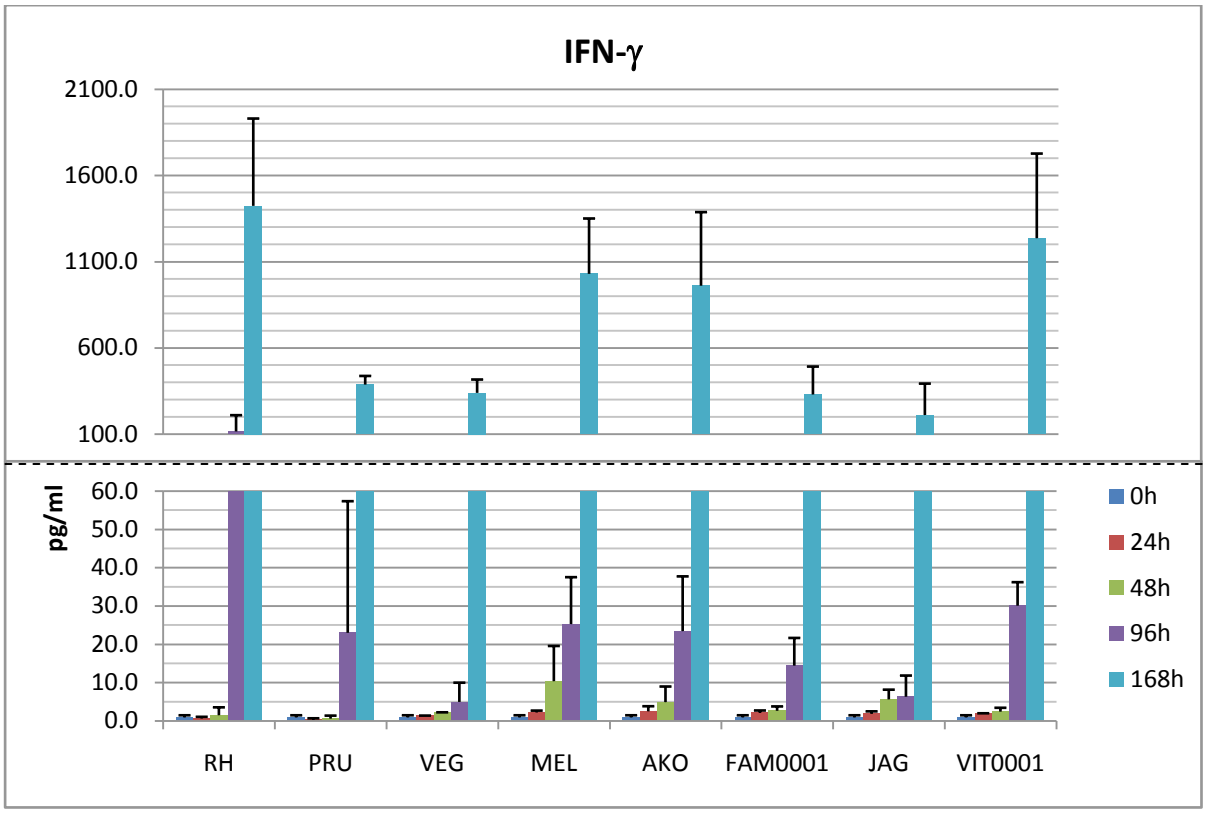
On retrouve les 3 groupes : PRU/JAG, VEG/FAM0001/FAM0002 et RH avec les autres souches. Dans ce dernier groupe, on a réarrangement des souches guyanaises. MEL et AKO sont toujours sur le même embranchement mais TOJ se retrouve à un embranchement plus loin. Il en va de même pour FAM0007 qui a maintenant un embranchement plus en amont par rapport au groupe WAY, GRO et VIT0001.

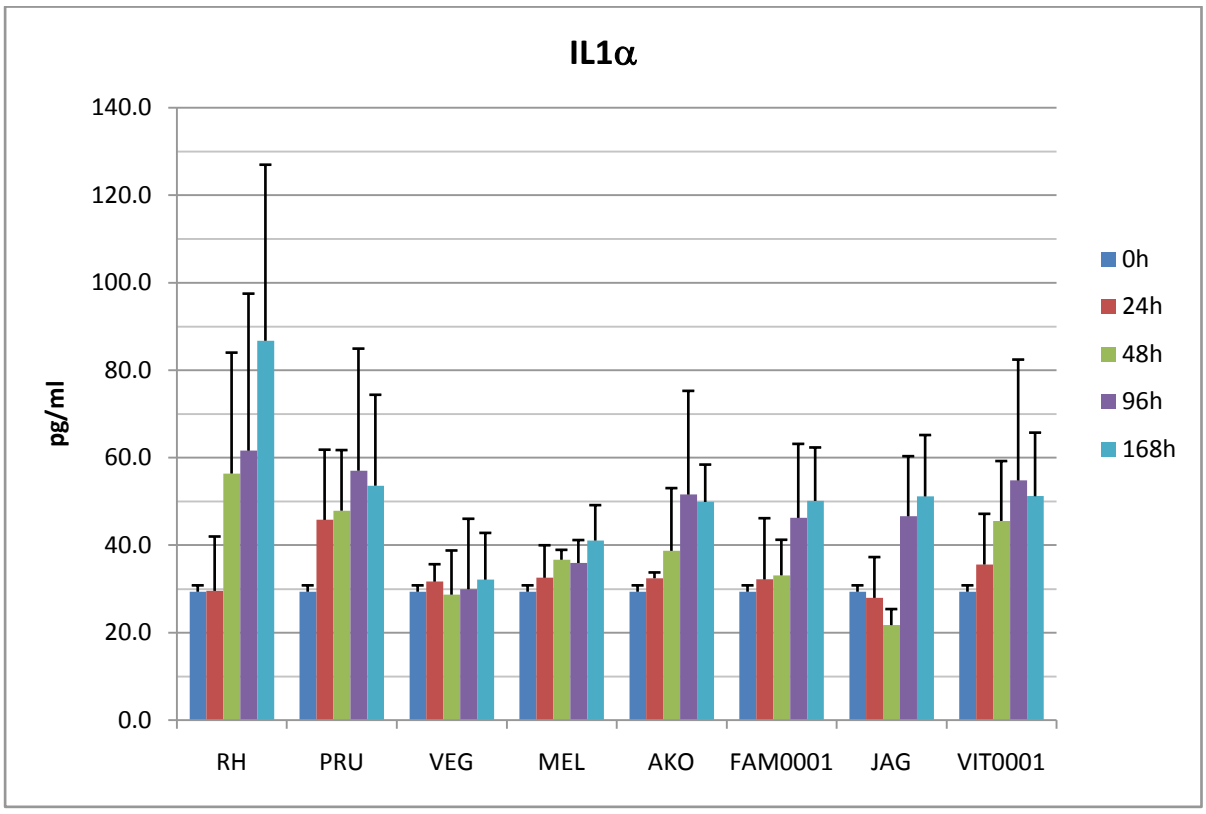
Dans ce type d'analyse en phylogramme, la longueur des branches représente le nombre d'événements évolutifs (comme les mutations) pour parvenir à la souche que l'on connait. Etant donné que toutes ces souches sont issues d'un ancêtre commun, on pourrait supposer que cet ancêtre commun était hautement virulent et qu'au fil de l'évolution, les nouvelles souches qui apparaissent perdent leur caractère virulent.

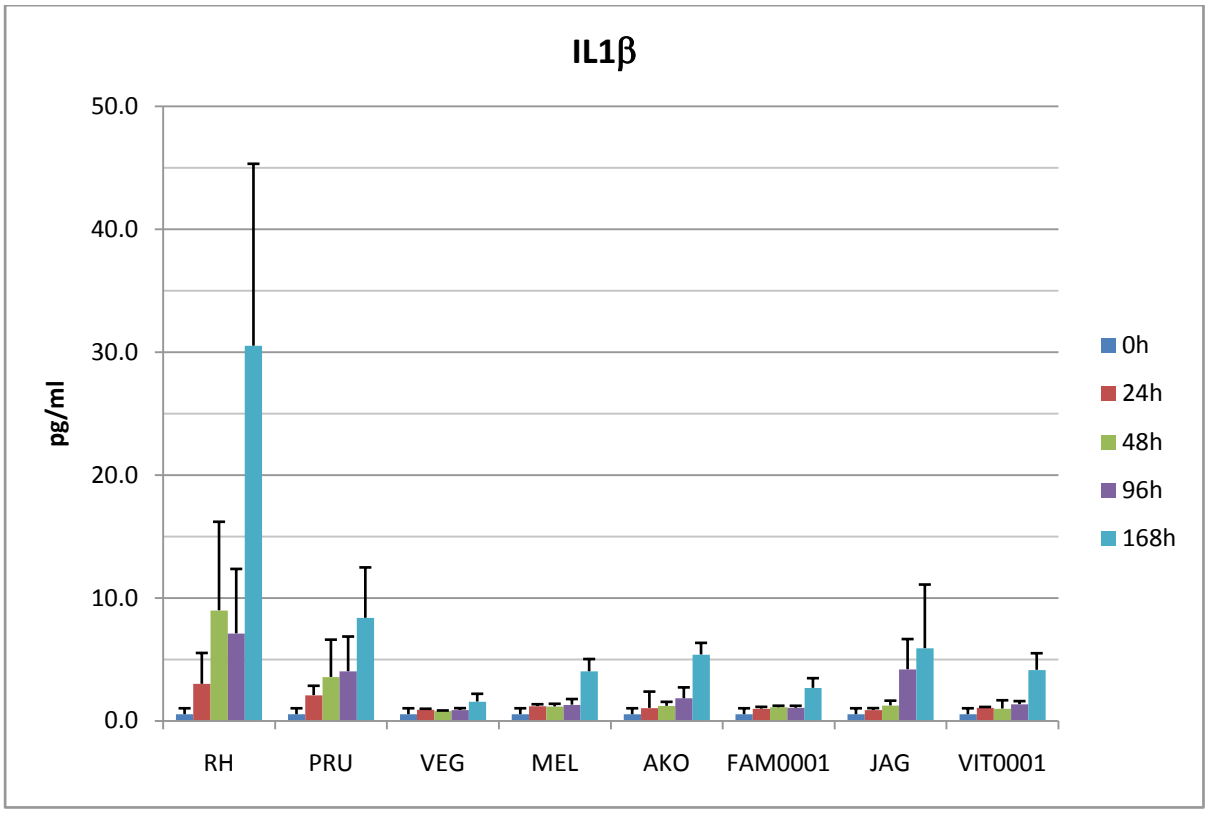
VI. 9. Annexe 9 : Résultats des dosages des 23 cytokines – chemokines par Luminex

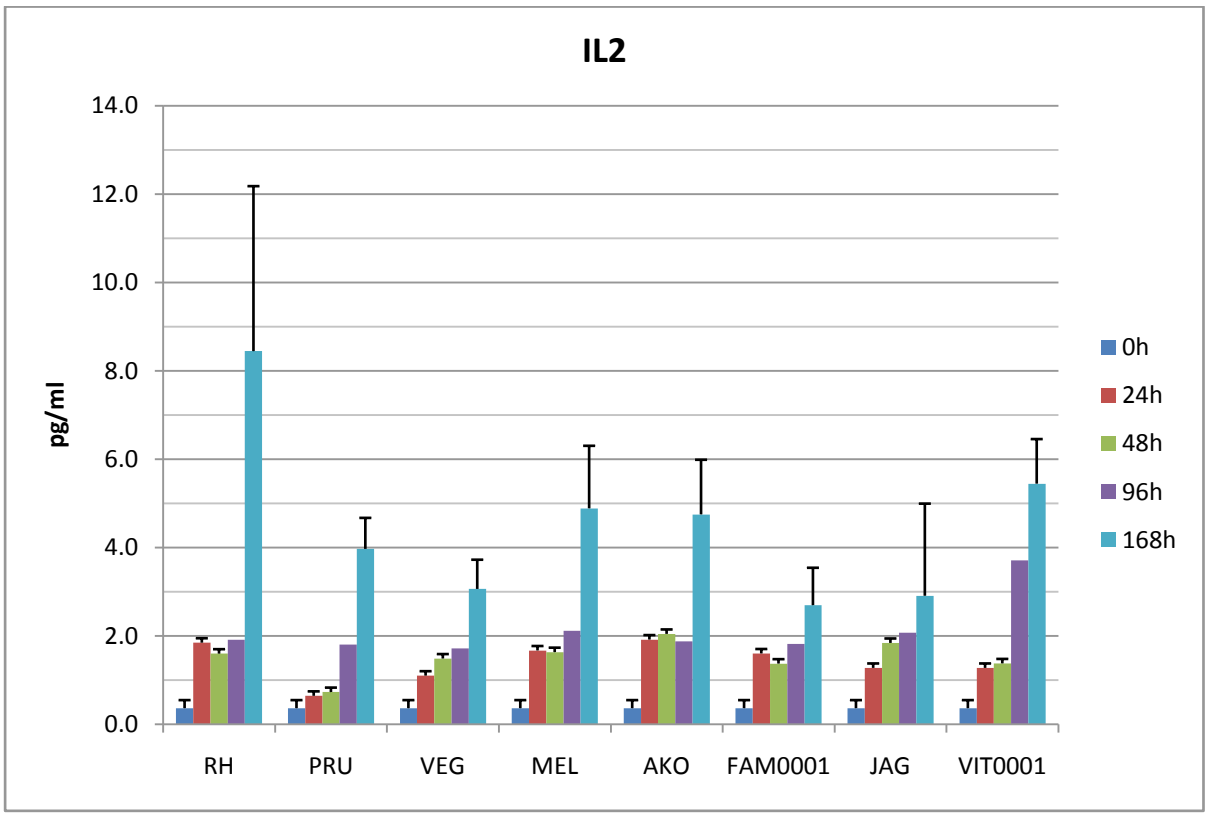


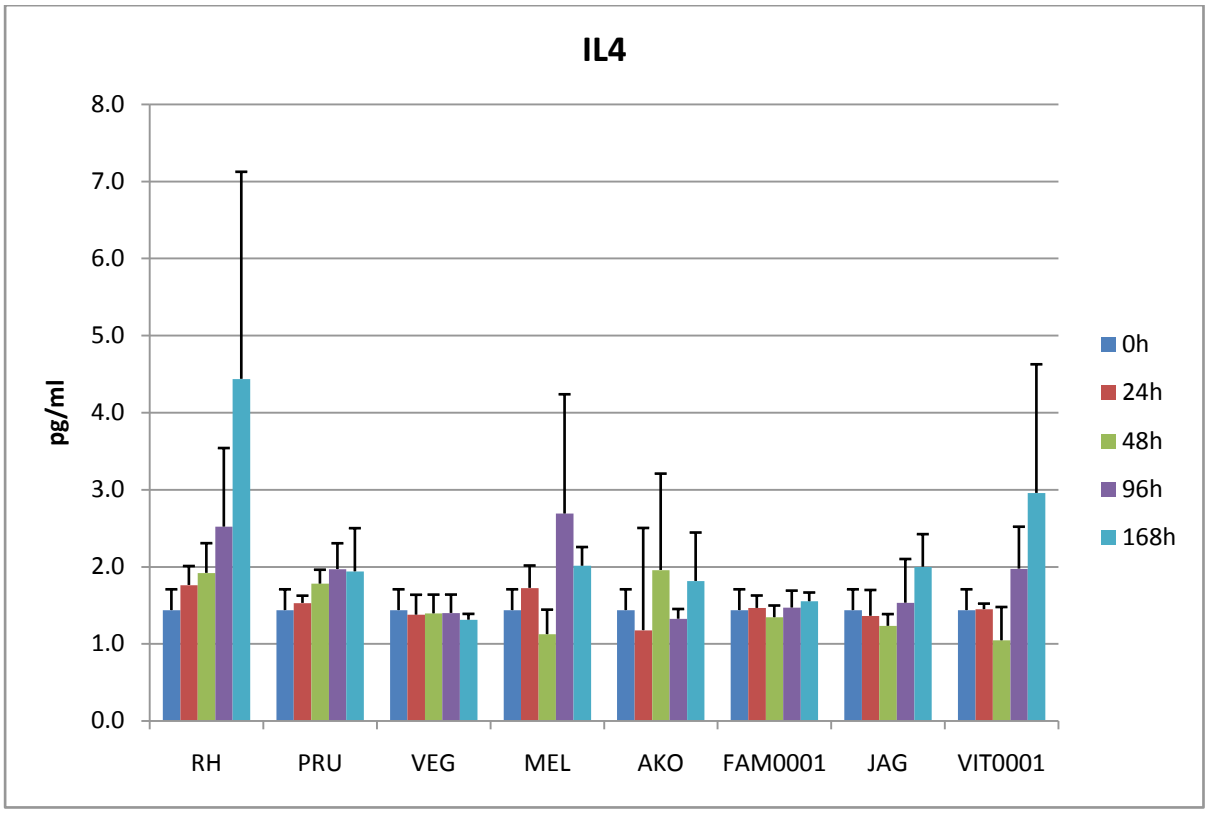


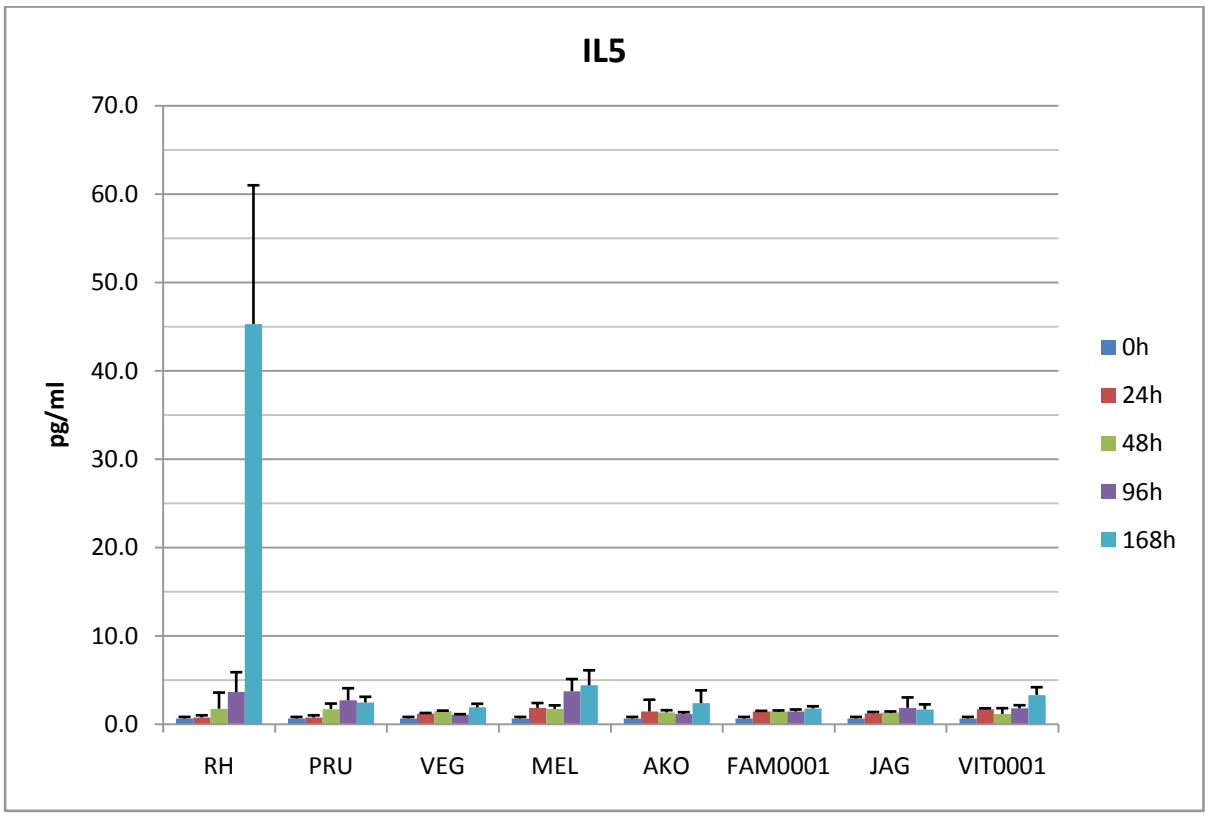

IFN-γ
2100.0
1600.0
1100.0
600.0
100.0
pg/ml
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

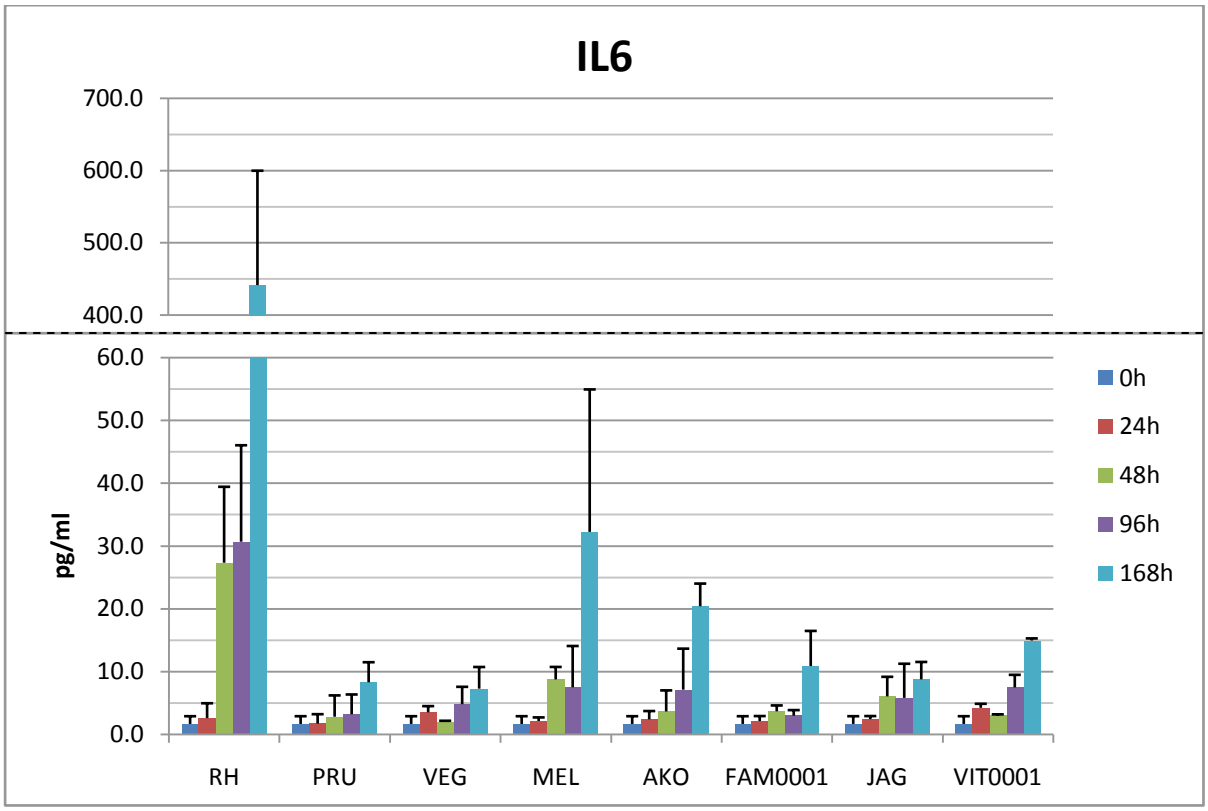

IL1α
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

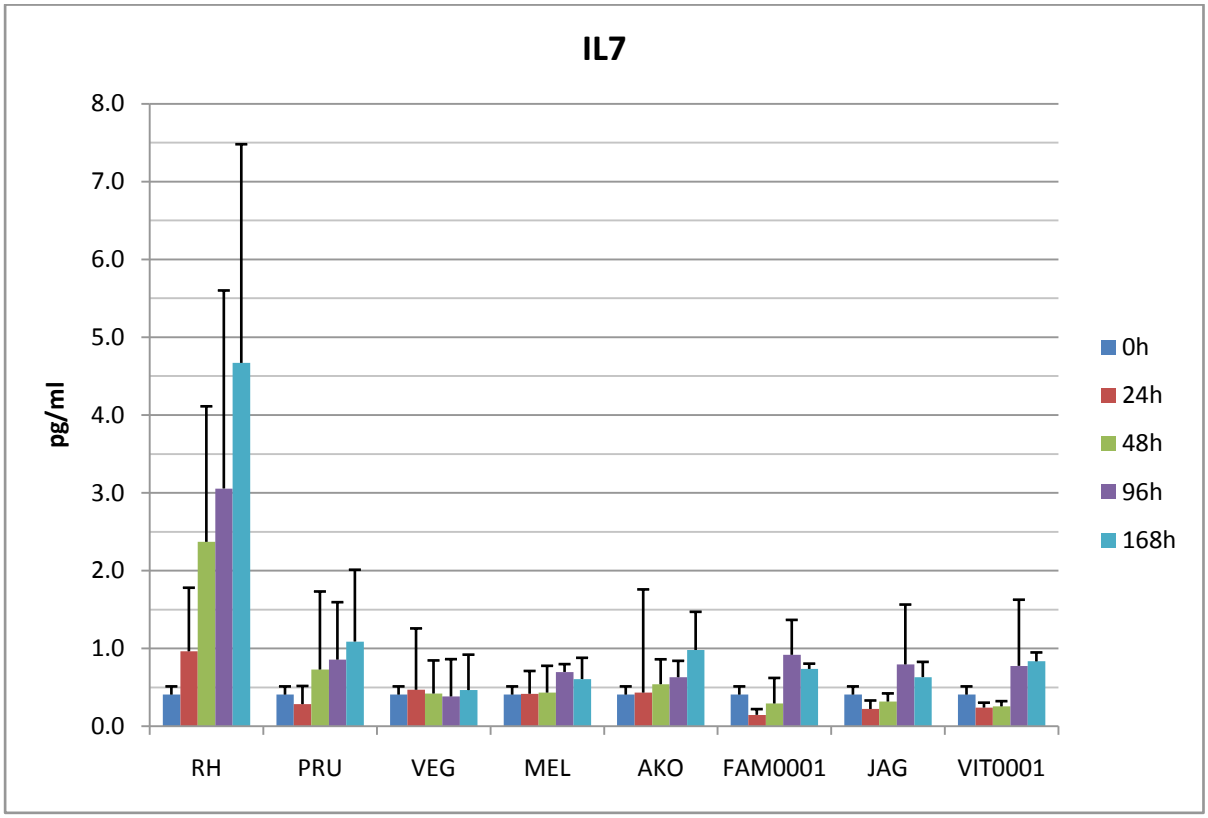

IL1β
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

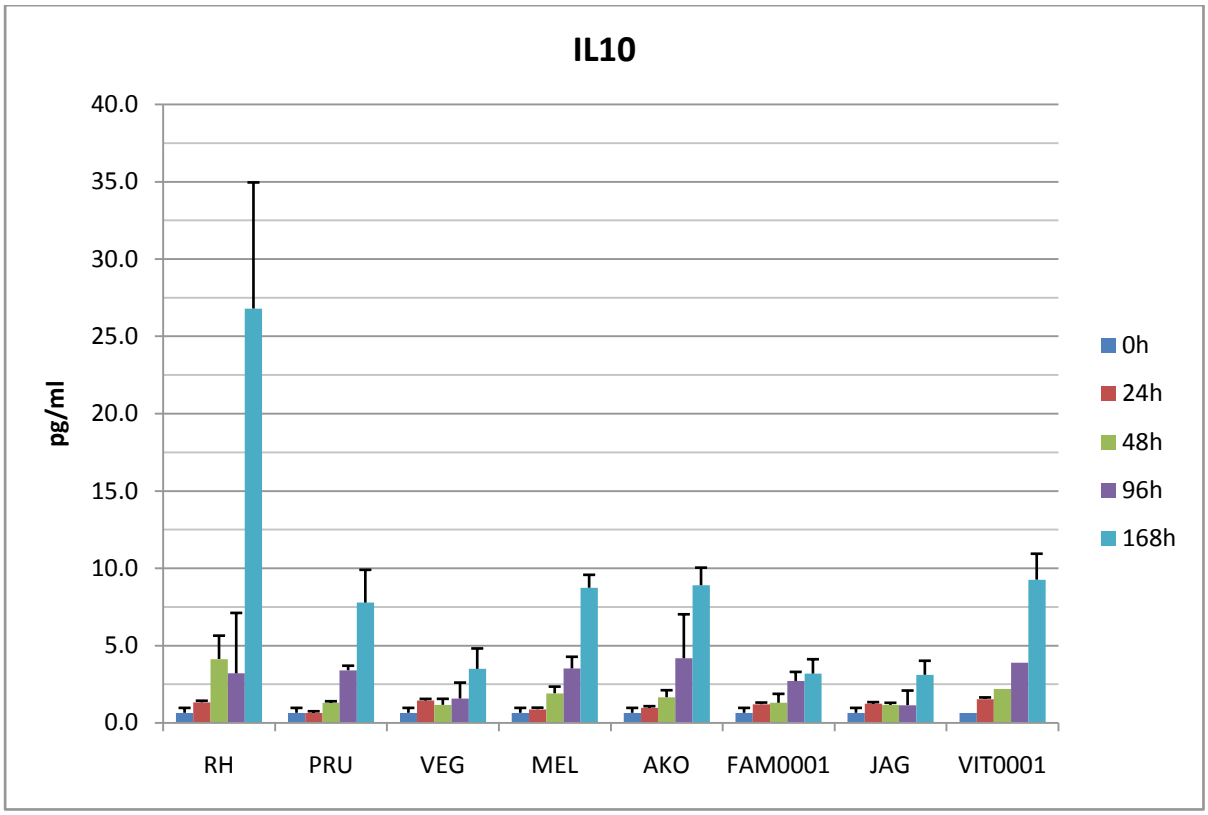

IL2
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

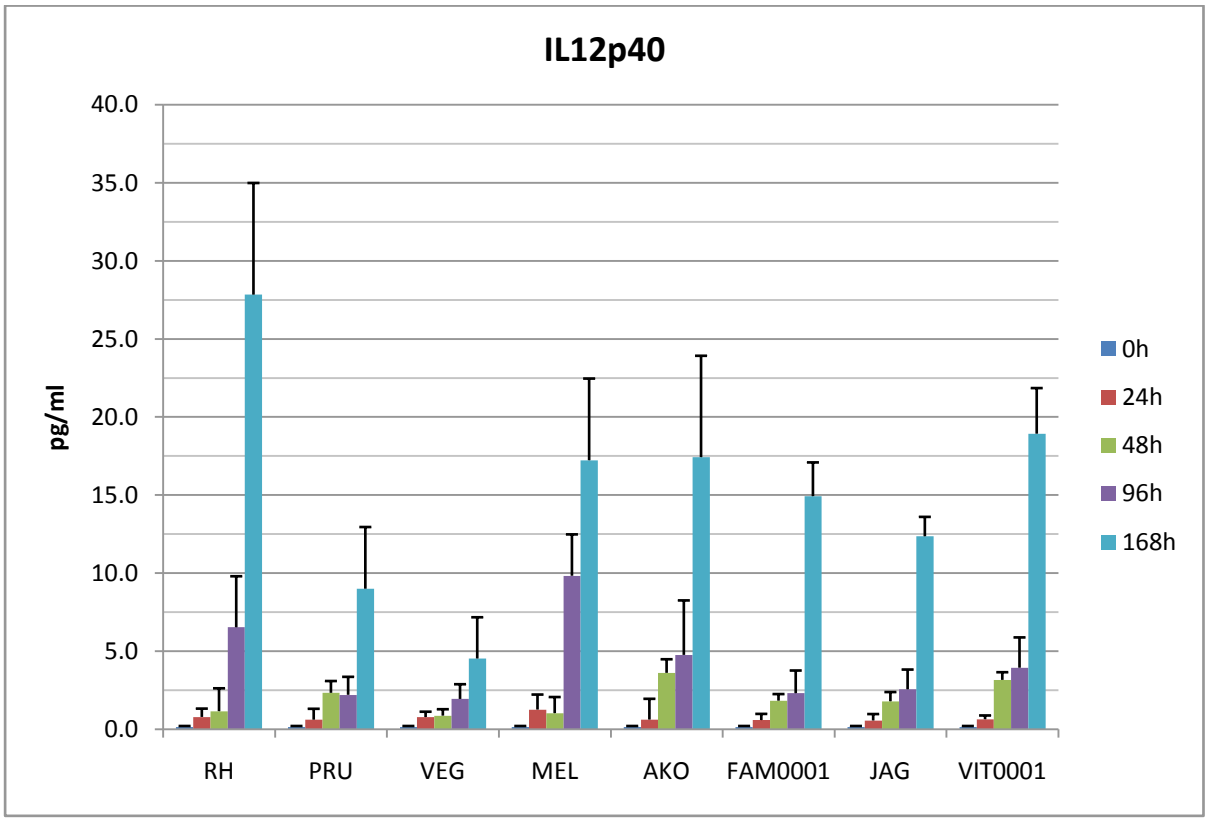

IL4
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

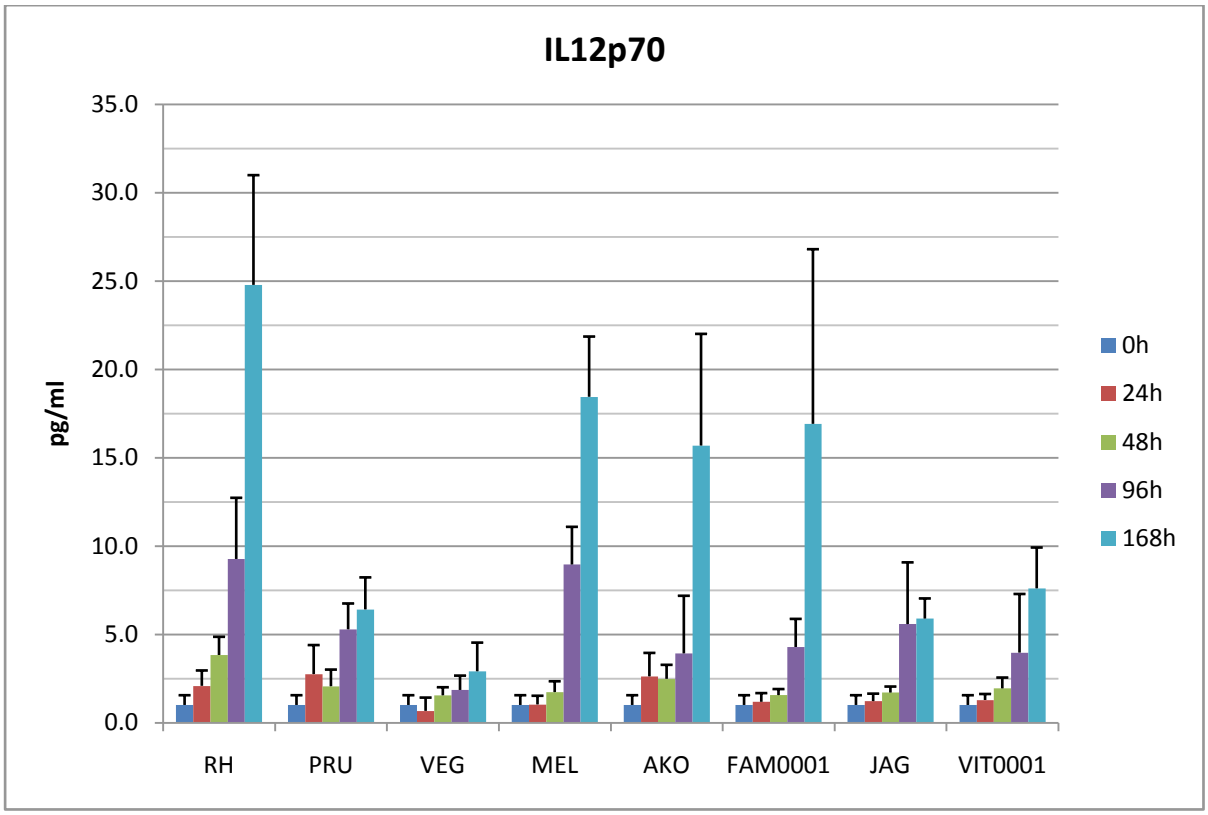

IL5
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

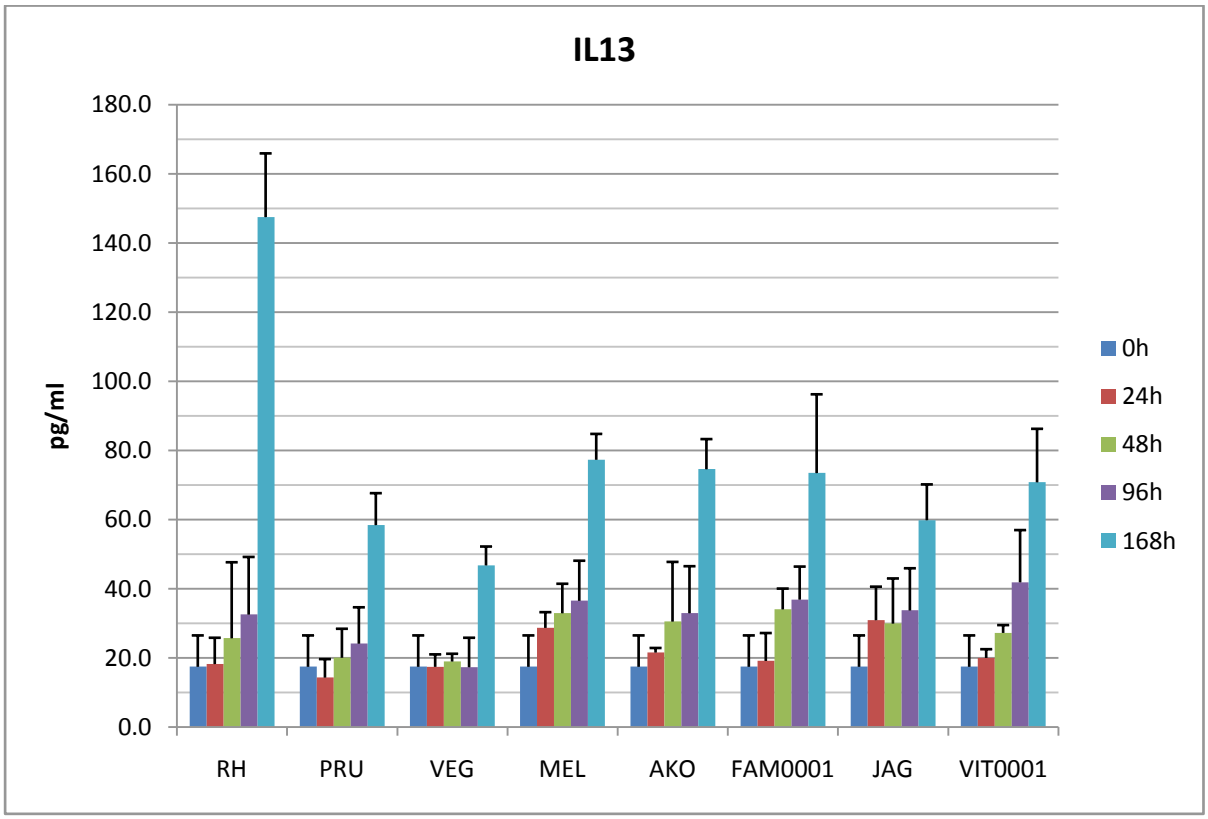

IL6
700.0
600.0
500.0
400.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

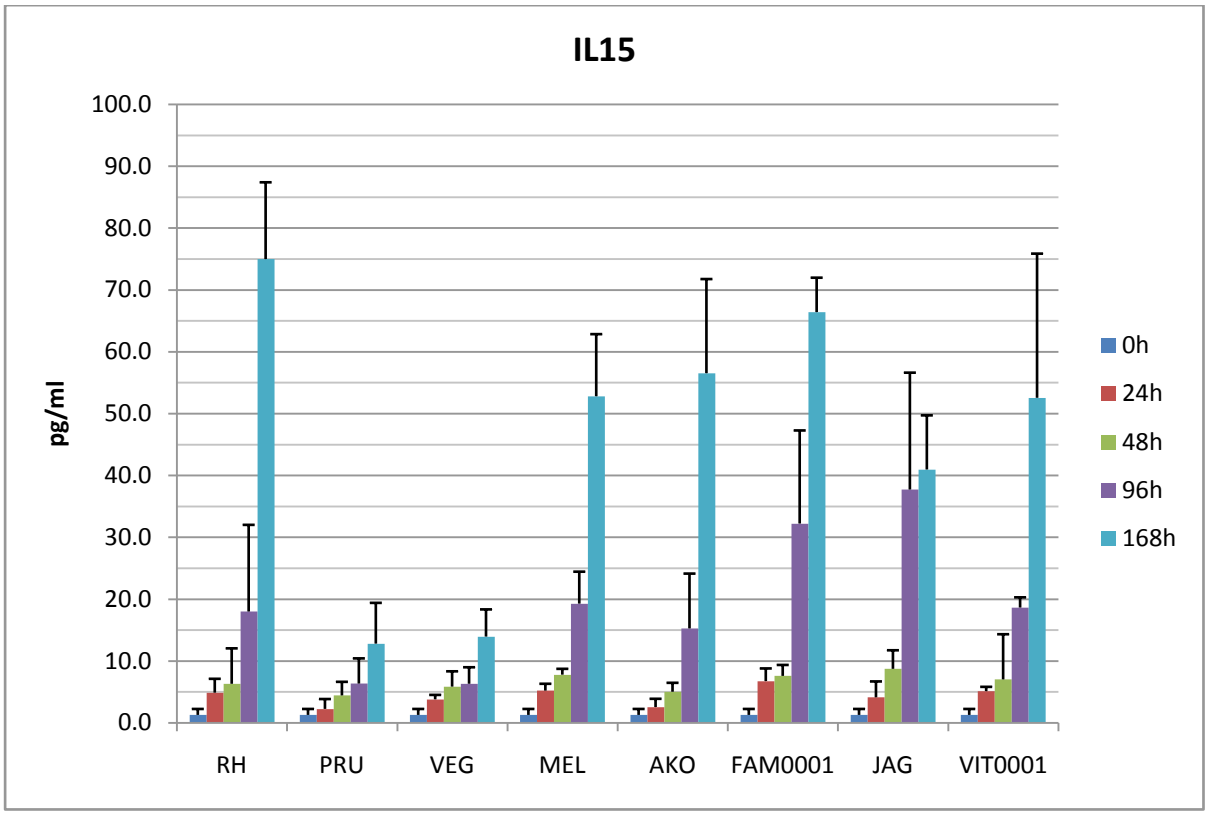

IL7
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

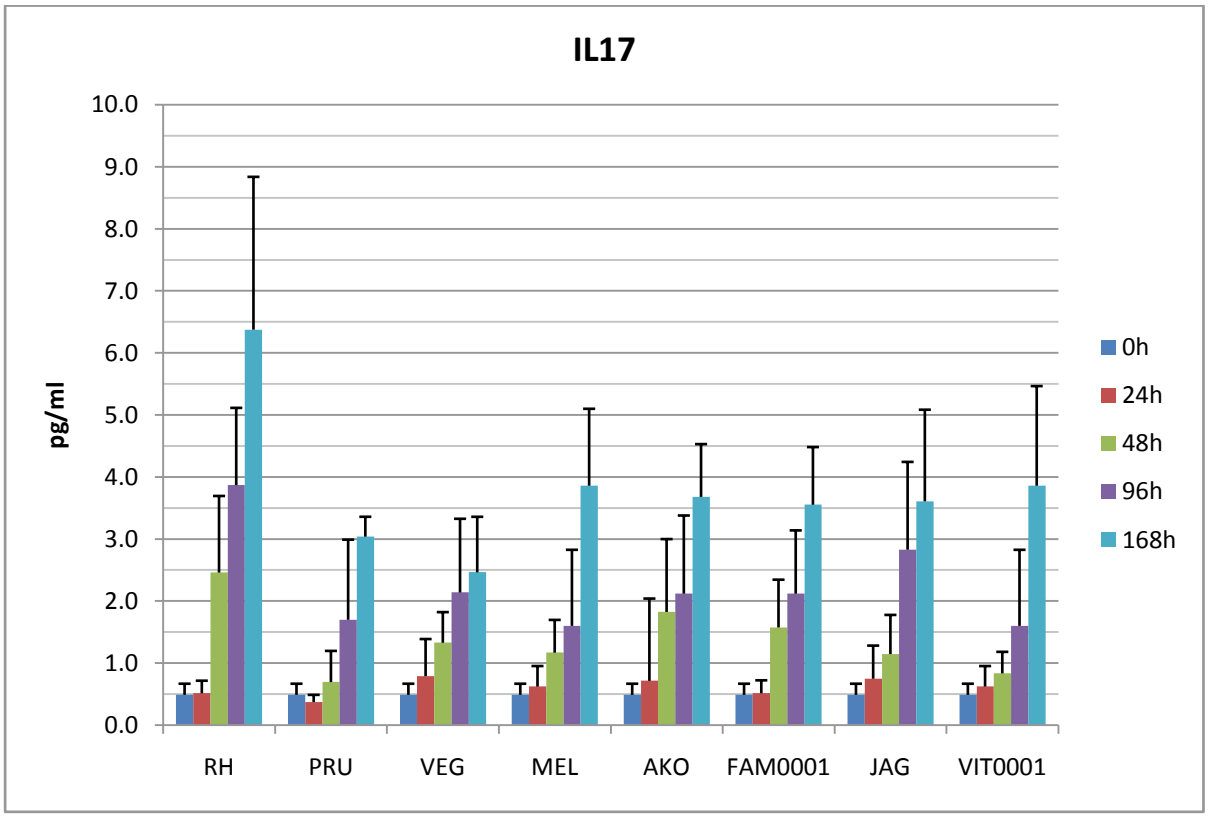

IL10
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

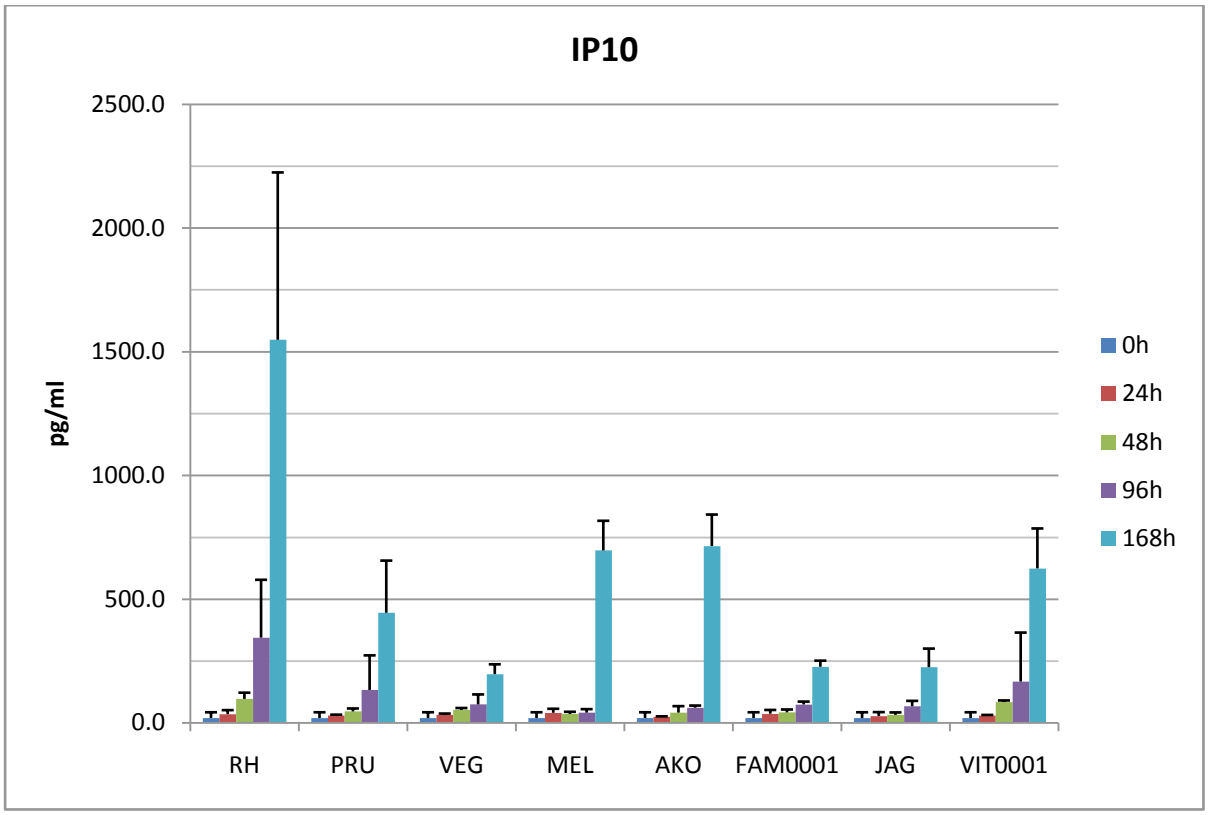

IL12p40
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

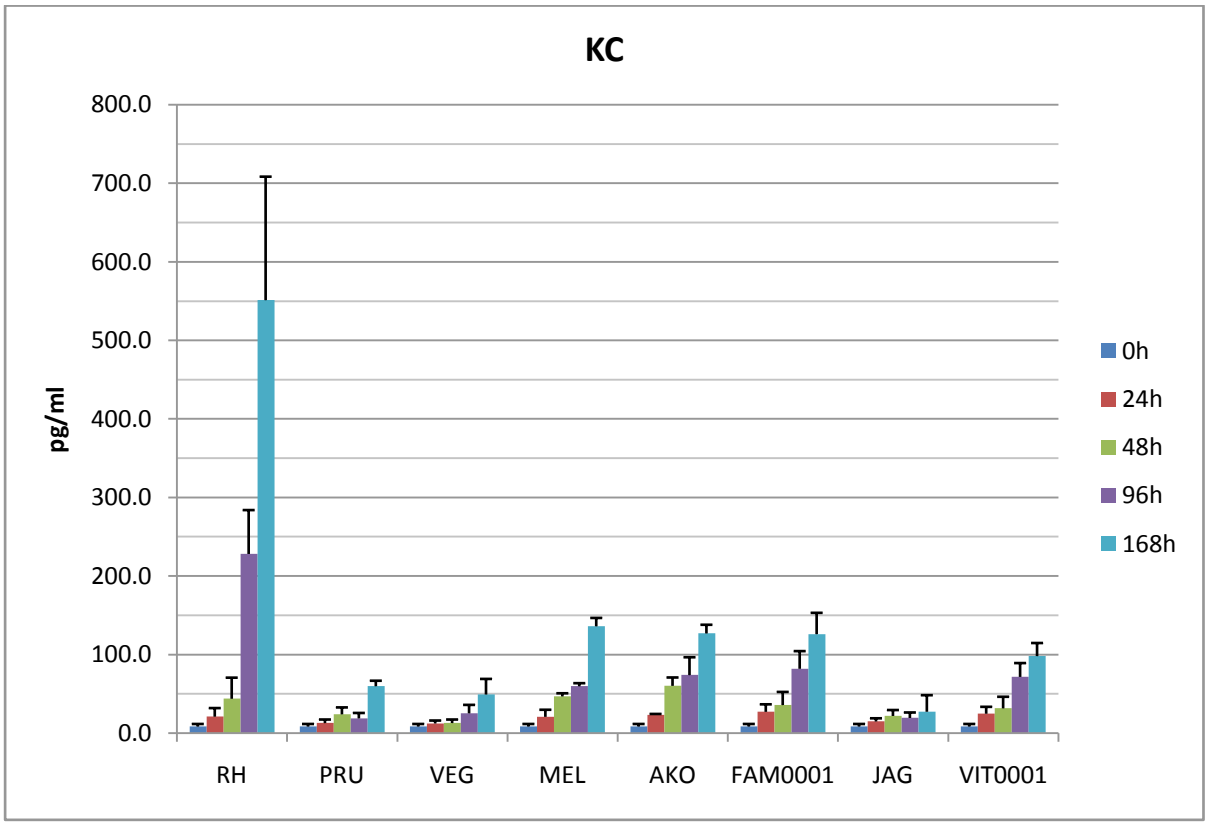

IL12p70
pg/ml
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

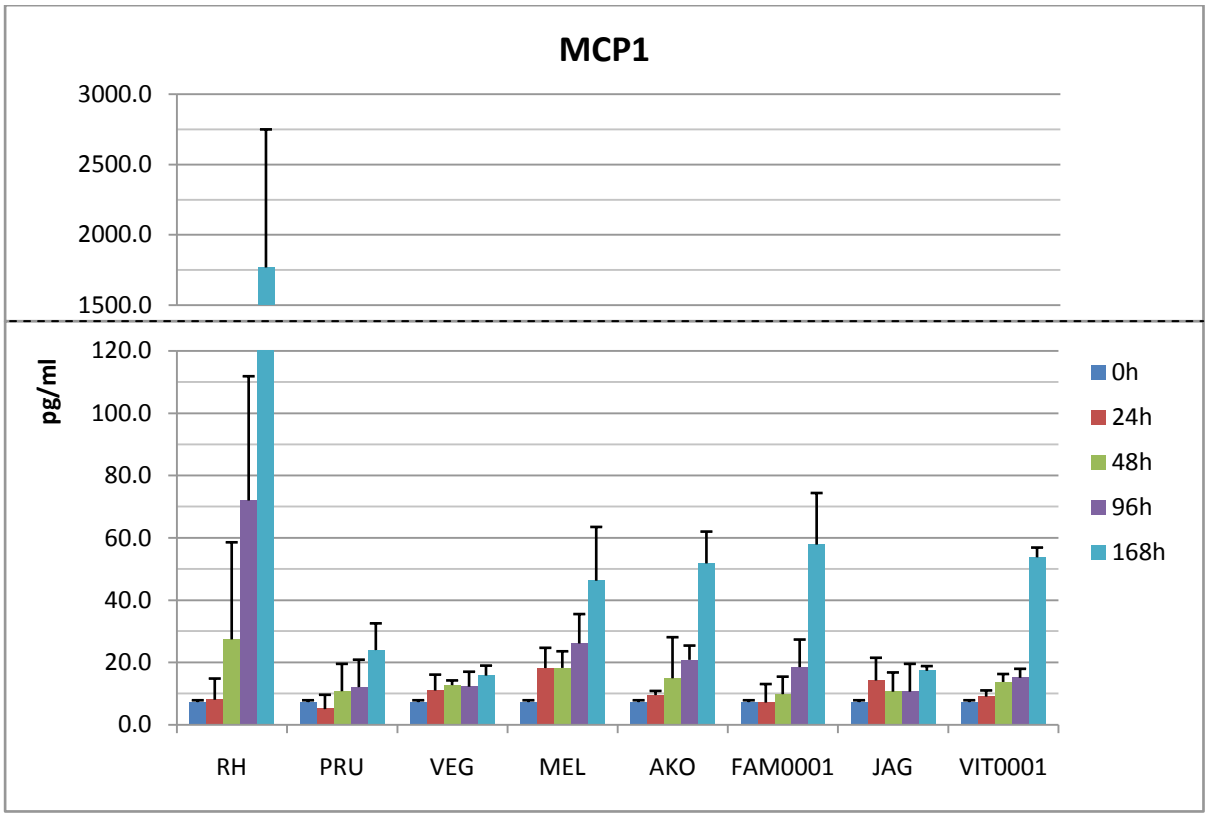

IL13
pg/ml
180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

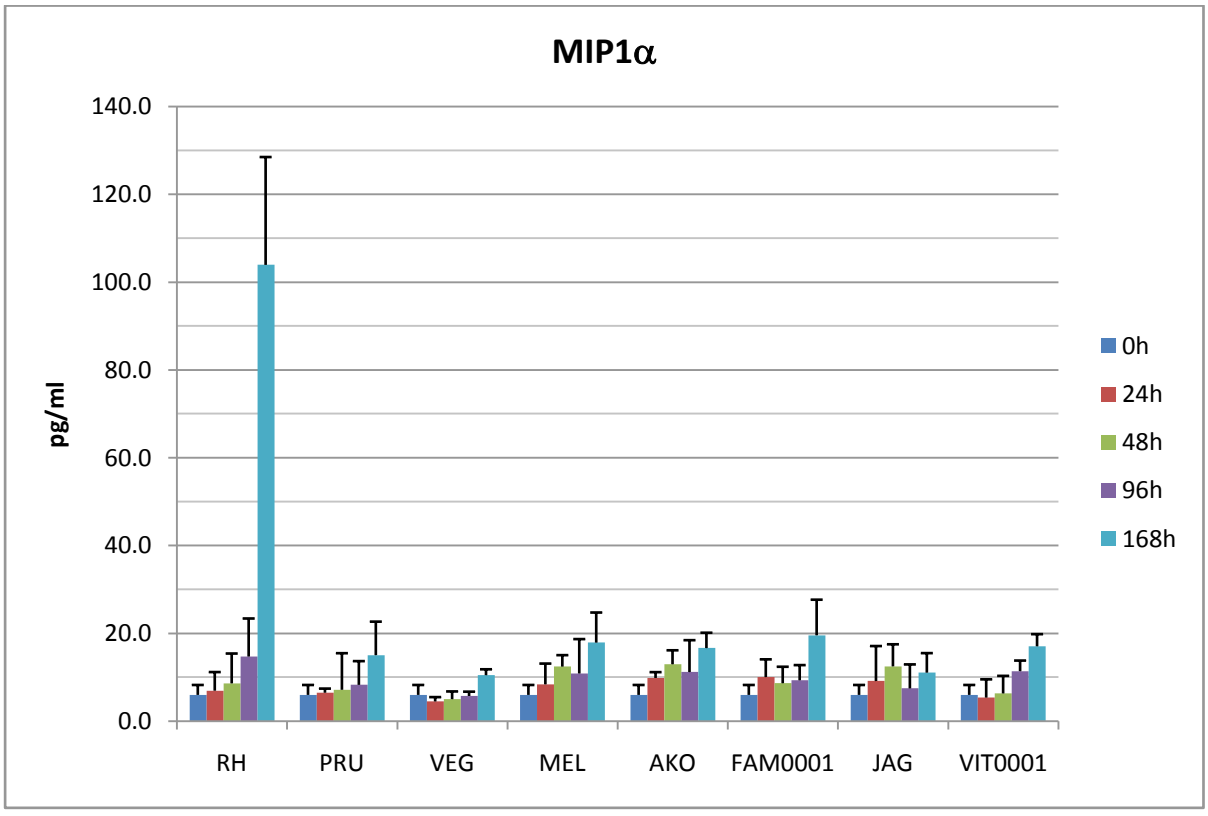

IL15
pg/ml
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

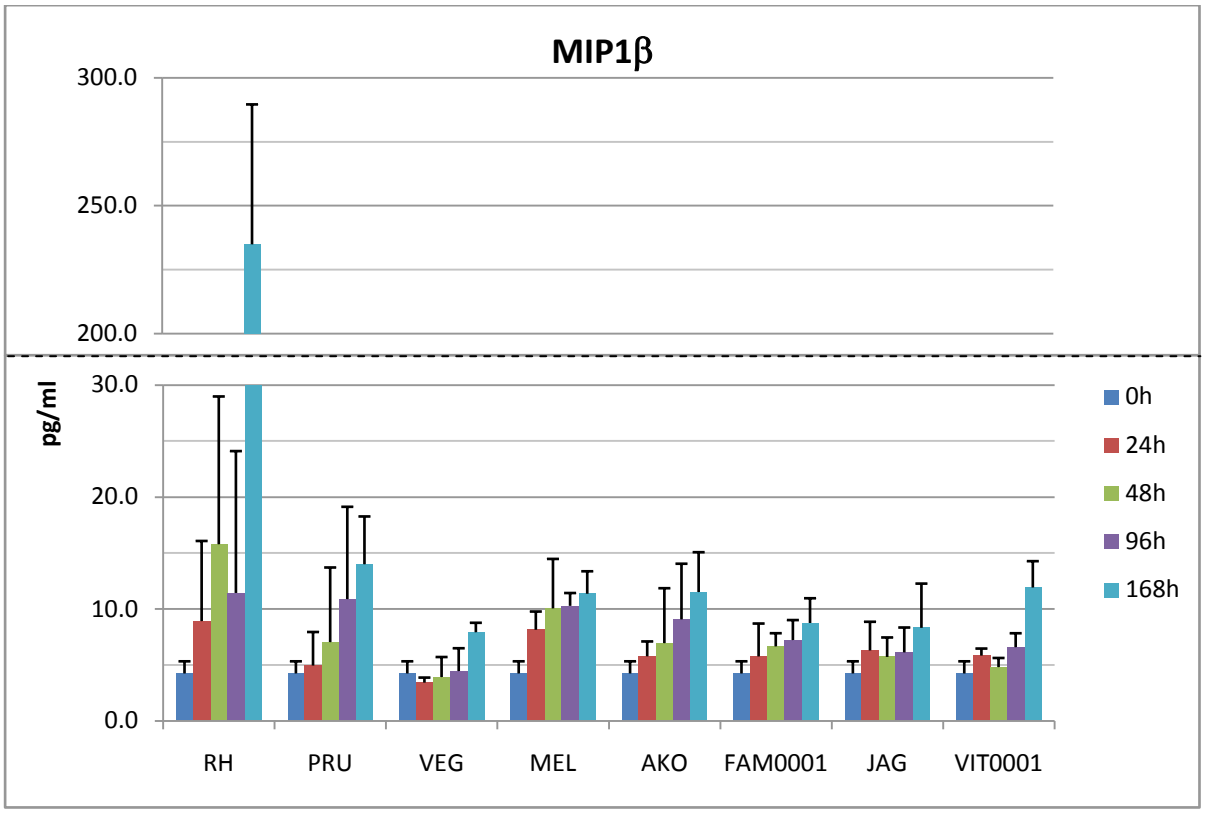

IL17
pg/ml
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

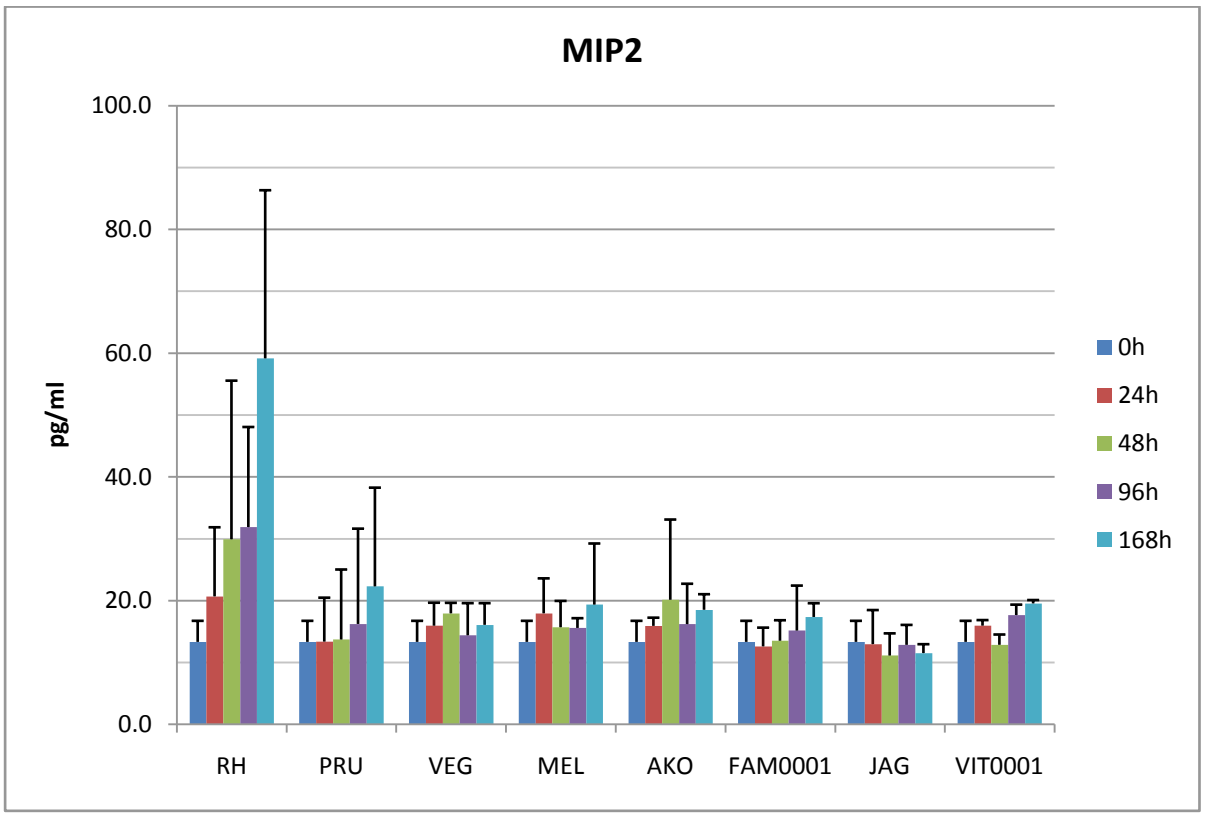

IP10
2500.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

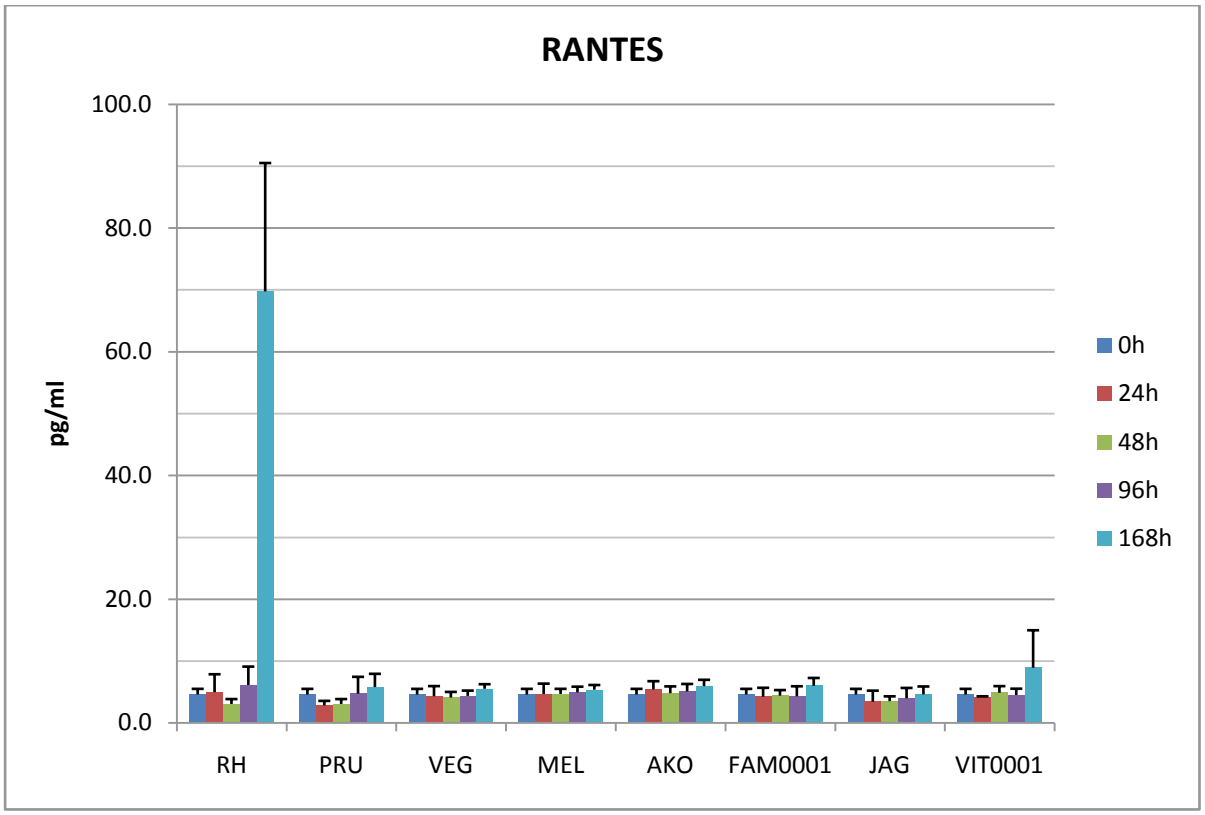

KC
800.0
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

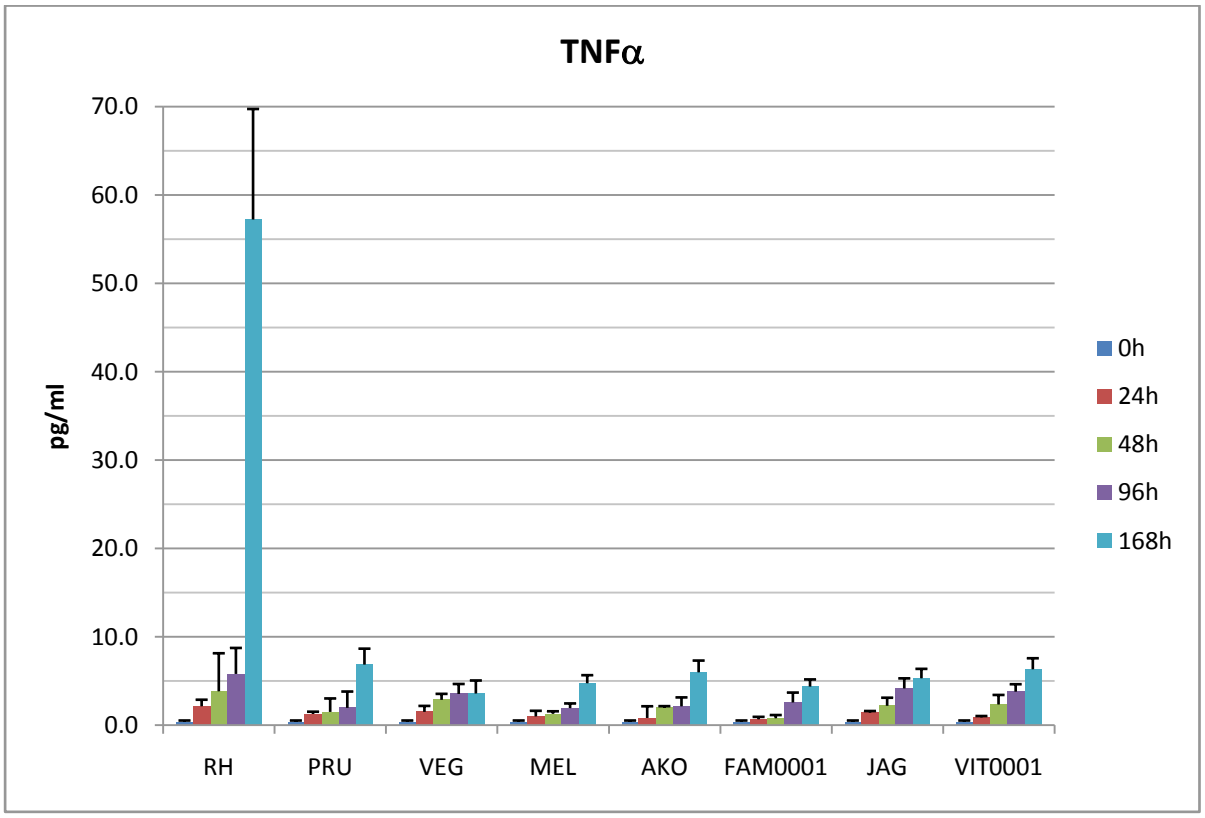

MCP1
3000.0
2500.0
2000.0
1500.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
pg/ml
0h
24h
48h
96h
168h
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001


MIP1α
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
pg/ml
0h
24h
48h
96h
168h
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001


MIP1β
300.0
250.0
200.0
pg/ml
30.0
20.0
10.0
0.0
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h


MIP2
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h


RANTES
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h


TNFα
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
pg/ml
RH
PRU
VEG
MEL
AKO
FAM0001
JAG
VIT0001
0h
24h
48h
96h
168h

VII. BIBLIOGRAPHIE

Addinsoft. 2017. XLSTAT 2017: Logiciel de statistiques et d'analyse de données pour Microsoft Excel. Paris, France. .

Agop-Nersesian C., Egarter S., Langsley G., Foth B. J., Ferguson D. J. and Meissner M. 2010. Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B. PLoS pathogens 6: e1001029.

Ahmad N. and Qayyum M. 2014. Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis in large ruminants in northern Punjab, Pakistan. Journal of infection in developing countries 8: 1022-1028.

Ajioka J. W., Fitzpatrick J. M., Reitter C. P. 2001. Toxoplasma gondii genomics: sheddinglight on pathogenesis and chemotherapy. Expert Revews in Molecular Medecine. 2001: 1-19.

Ajioka J. W. 1998. Toxoplasma gondii: ESTs and gene discovery. International journal for parasitology 28: 1025-1031.

Ajzenberg D., Banuls A. L., Su C., Dumetre A., Demar M., Carme B. and Darde M. L. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in Toxoplasma gondii. International journal for parasitology 34: 1185-1196.

Ajzenberg D., Banuls A. L., Tibayrenc M. and Darde M. L. 2002. Microsatellite analysis of Toxoplasma gondii shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. International journal for parasitology 32: 27-38.

Ajzenberg D., Collinet F., Mercier A., Vignoles P. and Darde M. L. 2010. Genotyping of Toxoplasma gondii isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. Journal of clinical microbiology 48: 4641-4645.

Ajzenberg D., Dumetre A. and Darde M. L. 2005. Multiplex PCR for typing strains of Toxoplasma gondii. Journal of clinical microbiology 43: 1940-1943.

Ajzenberg D., Lamaury I., Demar M., Vautrin C., Cabie A., Simon S., Nicolas M., Desbois-Nogard N., Boukhari R., Riahi H., Darde M. L., Massip P., Dupon M., Preux P. M., Labrunie A. and Boncoeur M. P. 2016. Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of Toxoplasma gondii: A Prospective and Multicentric Study. PLoS neglected tropical diseases 10: e0004790.

Alanazi A. D. 2013. Determination of seropositivity for Toxoplasma gondii in sheep, goats and camels slaughtered for food and human consumptions in Riyadh municipal abattoirs, Saudi Arabia. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 43: 569-576.

Alazemi M. S. 2014. Prevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in aborted ewes in Kuwait. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 44: 393-396.

Aliberti J., Valenzuela J. G., Carruthers V. B., Hieny S., Andersen J., Charest H., Reis e Sousa C., Fairlamb A., Ribeiro J. M. and Sher A. 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. Nature immunology 4: 485-490.

Al-Kappany Y. M., Rajendran C., Abu-Elwafa S. A., Hilali M., Su C. and Dubey J. P. 2010. Genetic diversity of Toxoplasma gondii isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. The Journal of parasitology 96: 1112-1114.

Alvarado-Esquivel C., Estrada-Malacon M. A., Reyes-Hernandez S. O., Perez-Ramirez J. A., Trujillo-Lopez J. I., Villena I. and Dubey J. P. 2012a. High prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. The Journal of parasitology 98: 1248-1250.

Alvarado-Esquivel C., Gonzalez-Salazar A. M., Alvarado-Esquivel D., Ontiveros-Vazquez F., Vitela-Corrales J., Villena I. and Dubey J. P. 2012b. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in chickens in Durango State, Mexico. The Journal of parasitology 98: 431-432.

Alvarado-Esquivel C., Romero-Salas D., Garcia-Vazquez Z., Crivelli-Diaz M., Barrientos-Morales M., Lopez-de-Buen L. and Dubey J. P. 2014. Seroprevalence and correlates of Toxoplasma gondii infection in domestic pigs in Veracruz State, Mexico. Tropical animal health and production 46: 705-709.

Alvarado-Esquivel C., Silva-Aguilar D., Villena I. and Dubey J. P. 2013a. Seroprevalence and correlates of Toxoplasma gondii infection in domestic sheep in Michoacan State, Mexico. Preventive veterinary medicine 112: 433-437.

Alvarado-Esquivel C., Silva-Aguilar D., Villena I. and Dubey J. P. 2013b. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in dairy goats in Michoacan State, Mexico. The Journal of parasitology 99: 540-542.

Asai T., Miura S., Sibley L. D., Okabayashi H. and Takeuchi T. 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan Toxoplasma gondii. The Journal of biological chemistry 270: 11391-11397.

Astorga R. J., Reguillo L., Hernandez M., Cardoso-Toset F., Tarradas C., Maldonado A. and Gomez-Laguna J. 2014. Serosurvey on schmallenberg virus and selected ovine reproductive pathogens in culled ewes from southern Spain. Transboundary and emerging diseases 61: 4-11.

Avci P., Karimi M., Sadasivam M., Antunes-Melo W. C., Carrasco E., Hamblin M. R. 2018. In-vivo monitoring of infectious diseases in living animals using bioluminescence imaging. Virulence 9: 28-63.

Azizi H., Shiran B., Boroujeni A. B. and Jafari M. 2014. Molecular Survey of Toxoplasma gondii in Sheep, Cattle and Meat Products in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Southwest of Iran. Iranian journal of parasitology 9: 429-434.

Bacci C., Vismarra A., Mangia C., Bonardi S., Bruini I., Genchi M., Kramer L. and Brindani F. 2015. Detection of Toxoplasma gondii in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. International journal of food microbiology 202: 54-56.

Bahl A., Davis P. H., Behnke M., Dzierszinski F., Jagalur M., Chen F., Shanmugam D., White M. W., Kulp D. and Roos D. S. 2010. A novel multifunctional oligonucleotide microarray for Toxoplasma gondii. BMC genomics 11: 603-2164-11-603.

Barakat A. M., Salem L. M., El-Newishy A. M., Shaapan R. M. and El-Mahllawy E. K. 2012. Zoonotic chicken toxoplasmosis in some Egyptians governorates. Pakistan journal of biological sciences : PJBS 15: 821-826.

Barrett L. G., Thrall P. H., Burdon J. J., Linde C. C. 2008. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. Trends Ecol Evol. 23(12): 678-85.

Barreiro L. B., Laval G., Quach H., Patin E. and Quintana-Murci L. 2008. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. Nature genetics 40: 340-345.

Basavaraju A. 2016. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. Tropical parasitology 6: 129-135.

Baum J., Papenfuss A. T., Baum B., Speed T. P. and Cowman A. F. 2006. Regulation of apicomplexan actin-based motility. Nature reviews.Microbiology 4: 621-628.

Beck H. P., Blake D., Darde M. L., Felger I., Pedraza-Diaz S., Regidor-Cerrillo J., Gomez-Bautista M., Ortega-Mora L. M., Putignani L., Shiels B., Tait A. and Weir W. 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. International journal for parasitology 39: 175-189.

Behnke M. S., Fentress S. J., Mashayekhi M., Li L. X., Taylor G. A. and Sibley L. D. 2012. The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in Toxoplasma gondii by regulating the active kinase ROP18. PLoS pathogens 8: e1002992.

Behnke M. S., Khan A., Lauron E. J., Jimah J. R., Wang Q., Tolia N. H. and Sibley L. D. 2015. Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of Toxoplasma gondii. PLoS genetics 11: e1005434.

Behnke M. S., Khan A., Wootton J. C., Dubey J. P., Tang K. and Sibley L. D. 2011. Virulence differences in Toxoplasma mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108: 9631-9636.

Bertranpetit E., Jombart T., Paradis E., Pena H., Dubey J., Su C., Mercier A., Devillard S. and Ajzenberg D. 2017. Phylogeography of Toxoplasma gondii points to a South American origin. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 48: 150-155.

Bettiol S. S., Obendorf D. L., Nowarkowski M., Milstein T. and Goldsmid J. M. 2000. Earthworms as paratenic hosts of toxoplasmosis in eastern barred bandicoots in Tasmania. Journal of wildlife diseases 36: 145-148.

Bisanz C., Bastien O., Grando D., Jouhet J., Marechal E. and Cesbron-Delauw M. F. 2006. Toxoplasma gondii acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. The Biochemical journal 394: 197-205.

Blackston C. R., Dubey J. P., Dotson E., Su C., Thulliez P., Sibley D. and Lehmann T. 2001. High-resolution typing of Toxoplasma gondii using microsatellite loci. The Journal of parasitology 87: 1472-1475.

Blaizot R., Nabet C., Blanchet D., Martin E., Mercier A., Darde M. L., Elenga N. and Demar M. 2018. Pediatric Amazonian Toxoplasmosis Caused by Atypical Strains in French Guiana, 2002-2017. The Pediatric infectious disease journal.

Bonneaud C., Giraudeau M., Tardy L., Staley M., Hill G. E., McGraw K. J. 2018. Rapid Antagonistic Coevolution in an Emerging Pathogen and Its Vertebrate Host. Curr Biol. 28(18): 2978-2983.

Bontell I. L., Hall N., Ashelford K. E., Dubey J. P., Boyle J. P., Lindh J. and Smith J. E. 2009. Whole genome sequencing of a natural recombinant Toxoplasma gondii strain reveals chromosome sorting and local allelic variants. Genome biology 10: R53-2009-10-5-r53. Epub 2009 May 20.

Boothroyd J. C. and Grigg M. E. 2002. Population biology of Toxoplasma gondii and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? Current opinion in microbiology 5: 438-442.

Bossi P., Caumes E., Paris L., Darde M. L. and Bricaire F. 1998. Toxoplasma gondii-associated Guillain-Barre syndrome in an immunocompetent patient. Journal of clinical microbiology 36: 3724-3725.

Boughattas S., Abdallah R. B., Siala E., Aoun K. and Bouratbine A. 2011. An atypical strain associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia. The new microbiologica 34: 413-416.

Boughattas S., Ayari K., Sa T., Aoun K. and Bouratbine A. 2014. Survey of the parasite Toxoplasma gondii in human consumed ovine meat in Tunis City. PloS one 9: e85044.

Boyle J. P., Rajasekar B., Saeij J. P., Ajioka J. W., Berriman M., Paulsen I., Roos D. S., Sibley L. D., White M. W. and Boothroyd J. C. 2006. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like Toxoplasma gondii.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 10514-10519.

Bram R. J. and Crabtree G. R. 1994. Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. Nature 371: 355-358.

Butcher B. A., Fox B. A., Rommereim L. M., Kim S. G., Maurer K. J., Yarovinsky F., Herbert D. R., Bzik D. J. and Denkers E. Y. 2011. Toxoplasma gondii rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. PLoS pathogens 7: e1002236.

Buzoni-Gatel D., Dubremetz J. F. and Werts C. 2008. Molecular cross talk between Toxoplasma gondii and the host immune system. Medecine sciences : M/S 24: 191-196.

Cai Y., Shen J. 2017. Modulation of host immune responses to Toxoplasma gondii by microRNAs. Parasite Immunology 39.

Carme B., Bissuel F., Ajzenberg D., Bouyne R., Aznar C., Demar M., Bichat S., Louvel D., Bourbigot A. M., Peneau C., Neron P. and Darde M. L. 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. Journal of clinical microbiology 40: 4037-4044.

Carme B., Demar M., Ajzenberg D. and Darde M. L. 2009. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of Toxoplasma gondii, French Guiana. Emerging infectious diseases 15: 656-658.

Carme B. and Demar-Pierre M. 2006. La toxoplasmose en Guyane française : particularités (néo)tropicales d'une parasitose cosmopolite. Med Trop (Mars) 66: 495-503.

Carruthers V. and Boothroyd J. C. 2007. Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. Current opinion in microbiology 10: 83-89.

Carruthers V. B. and Sibley L. D. 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. European journal of cell biology 73: 114-123.

Casagrande R. A., Pena H. F., Cabral A. D., Rolim V. M., de Oliveira L. G., Boabaid F. M., Wouters A. T., Wouters F., Cruz C. E. and Driemeier D. 2015. Fatal systemic toxoplasmosis in Valley quail (Callipepla californica). International journal for parasitology.Parasites and wildlife 4: 264-267.

Cavailles P., Sergent V., Bisanz C., Papapietro O., Colacios C., Mas M., Subra J. F., Lagrange D., Calise M., Appolinaire S., Faraut T., Druet P., Saoudi A., Bessieres M. H., Pipy B., Cesbron-Delauw M. F. and Fournie G. J. 2006. The rat Toxo1 locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 744-749.

Cenci-Goga B. T., Ciampelli A., Sechi P., Veronesi F., Moretta I., Cambiotti V. and Thompson P. N. 2013. Seroprevalence and risk factors for Toxoplasma gondii in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. BMC veterinary research 9: 25-6148-9-25.

Cerede O., Dubremetz J. F., Soete M., Deslee D., Vial H., Bout D. and Lebrun M. 2005. Synergistic role of micronemal proteins in Toxoplasma gondii virulence. The Journal of experimental medicine 201: 453-463.

Chang Q. C., Zheng X., Qiu J. H., Wang C. R. and Zhu X. Q. 2013. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in fattening pigs in Northeast China. The Journal of parasitology 99: 544-545.

Chumpolbanchorn K., Lymbery A. J., Pallant L. J., Pan S., Sukthana Y. and Thompson R. C. 2013. A high prevalence of Toxoplasma in Australian chickens. Veterinary parasitology 196: 209-211.

Clementino Andrade M. M., Pinheiro B. V., Cunha M. M., Carneiro A. C., Andrade Neto V. F. and Vitor R. W. 2013. New gentotypes of Toxoplasma gondii obtained from farm animals in Northeast Brazil. Research in veterinary science 94: 587-589.

Cobadiova A., Reiterova K., Derdakova M., Spilovska S., Turcekova L., Hviscova I. and Hisira V. 2013. Toxoplasma gondii, Neospora caninum and tick-transmitted bacterium Anaplasma phagocytophilum infections in one selected goat farm in Slovakia. Acta parasitologica / Witold Stefanski Institute of Parasitology, Warszawa, Poland 58: 541-546.

Combrink M. P., Troskie P. C., Pienaar R., Latif A. A. and Mans B. J. 2014. Genotypic diversity in Babesia bovis field isolates and vaccine strains from South Africa. Veterinary parasitology 199: 144-152.

Computational Systems Biochemistry. PERSEUS. Available from: http://www.coxdocs.org/doku.php?id=perseus:start; .

Correia E. L., Feitosa T. F., Santos F. A., Azevedo S. S., Pena H. F., Gennari S. M., Mota R. A. and Alves C. J. 2015. Prevalence and risk factors for Toxoplasma gondii in sheep in the State of Paraiba, Northeastern Brazil. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria 24: 383-386.

Cosendey-KezenLeite R. I., de Oliveira F. C., Frazao-Teixeira E., Dubey J. P., de Souza G. N., Ferreira A. M. and Lilenbaum W. 2014. Occurrence and risk factors associated to Toxoplasma gondii infection in sheep from Rio de Janeiro, Brazil. Tropical animal health and production 46: 1463-1466.

Craver M. P. and Knoll L. J. 2007. Increased efficiency of homologous recombination in Toxoplasma gondii dense granule protein 3 demonstrates that GRA3 is not necessary in cell culture but does contribute to virulence. Molecular and biochemical parasitology 153: 149-157.

Crawford A., Angelosanto J. M., Nadwodny K. L., Blackburn S. D. and Wherry E. J. 2011. A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection. PLoS pathogens 7: e1002098.

Dabritz H. A. and Conrad P. A. 2010. Cats and Toxoplasma: implications for public health. Zoonoses and public health 57: 34-52.

Darde M. L., Bouteille B. and Pestre-Alexandre M. 1992. Isoenzyme analysis of 35 Toxoplasma gondii isolates and the biological and epidemiological implications. The Journal of parasitology 78: 786-794.

Darde M. L., Bouteille B. and Pestre-Alexandre M. 1988. Isoenzymic characterization of seven strains of Toxoplasma gondii by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 39: 551-558.

Darde M. L., Villena I., Pinon J. M. and Beguinot I. 1998. Severe toxoplasmosis caused by a Toxoplasma gondii strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. Journal of clinical microbiology 36: 324.

Davoust B., Mediannikov O., Sambou M., Roqueplo C., Demoncheaux J. P., Perret C., Guillot J. and Blaga R. 2014. Serological survey of animal toxoplasmosis in Senegal. Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990) .

de Sousa R. A., Lemos Jda F., Farias L. A., Lopes C. D. and dos Santos K. R. 2014. Seroprevalence and risk factors for Toxoplasma gondii infection in pigs in southern Piaui. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria 23: 98-100.

Deem S. L., Merkel J., Ballweber L., Vargas F. H., Cruz M. B. and Parker P. G. 2010. Exposure to Toxoplasma gondii in Galapagos Penguins (Spheniscus mendiculus) and flightless cormorants (Phalacrocorax harrisi) in the Galapagos Islands, Ecuador. Journal of wildlife diseases 46: 1005-1011.

Deksne G. and Kirjusina M. 2013. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in domestic pigs (Sus scrofa domestica) and wild boars (Sus scrofa) in Latvia. The Journal of parasitology 99: 44-47.

de-la-Torre A., Gonzalez G., Diaz-Ramirez J. and Gomez-Marin J. E. 2007. Screening by ophthalmoscopy for Toxoplasma retinochoroiditis in Colombia. American Journal of Ophthalmology 143: 354-356.

Delhaes L., Ajzenberg D., Sicot B., Bourgeot P., Darde M. L., Dei-Cas E. and Houfflin-Debarge V. 2010. Severe congenital toxoplasmosis due to a Toxoplasma gondii strain with an atypical genotype: case report and review. Prenatal diagnosis 30: 902-905.

Demar M., Ajzenberg D., Maubon D., Djossou F., Panchoe D., Punwasi W., Valery N., Peneau C., Daigre J. L., Aznar C., Cottrelle B., Terzan L., Darde M. L. and Carme B. 2007a. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. Clin Infect Dis 45: e88-95.

Demar M., Ajzenberg D., Maubon D., Djossou F., Panchoe D., Punwasi W., Valery N., Peneau C., Daigre J. L., Aznar C., Cottrelle B., Terzan L., Darde M. L. and Carme B. 2007b. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 45: e88-95.

Demar M., Ajzenberg D., Serrurier B., Darde M. L. and Carme B. 2008. Atypical Toxoplasma gondii strain from a free-living jaguar (Panthera onca) in French Guiana. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 78: 195-197.

Demar M., Hommel D., Djossou F., Peneau C., Boukhari R., Louvel D., Bourbigot A. M., Nasser V., Ajzenberg D., Darde M. L. and Carme B. 2012. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 18: E221-31.

Derouin F., Pelloux H. and ESCMID Study Group on Clinical Parasitology. 2008. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 14: 1089-1101.

Deshmane S. L., Kremlev S., Amini S. and Sawaya B. E. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 29: 313-326.

Desmonts G., Couvreur J., Alison F., Baudelot J., Gerbeaux J. and Lelong M. 1965. Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. Revue Française d'Etudes Biologiques et Cliniques 10: 952-958.

Devleesschauwer B., Pruvot M., Joshi D. D., De Craeye S., Jennes M., Ale A., Welinski A., Lama S., Aryal A., Victor B., Duchateau L., Speybroeck N., Vercruysse J. and Dorny P. 2013. Seroprevalence of zoonotic parasites in pigs slaughtered in the Kathmandu Valley of Nepal. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 13: 872-876.

Diakoua A., Papadopoulos E., Panousis N., Karatzias C. and Giadinis N. 2013. Toxoplasma gondii and Neospora caninum seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. Veterinary parasitology 198: 387-390.

Diaz J. M., Fernandez G., Prieto A., Valverde S., Lago N., Diaz P., Panadero R., Lopez C., Morrondo P. and Diez-Banos P. 2014. Epidemiology of reproductive pathogens in semi-intensive lamb-producing flocks in North-West Spain: a comparative serological study. Veterinary journal (London, England : 1997) 200: 335-338.

Dinarello C. A. 1997. Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. Seminars in oncology 24: S9-81-S9-93.

Djokic V., Klun I., Musella V., Rinaldi L., Cringoli G., Sotiraki S. and Djurkovic-Djakovic O. 2014. Spatial epidemiology of Toxoplasma gondii infection in goats in Serbia. Geospatial health 8: 479-488.

Du J., An R., Chen L., Shen Y., Chen Y., Cheng L., Jiang Z., Zhang A., Yu L., Chu D., Shen Y., Luo Q., Chen H., Wan L., Li M., Xu X. and Shen J. 2014. Toxoplasma gondii virulence factor ROP18 inhibits the host NF-kappaB pathway by promoting p65 degradation. The Journal of biological chemistry 289: 12578-12592.

Dubey J. P. 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second edition., Boca Raton ed, Florida.

Dubey J. P. 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of Toxoplasma gondii for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. Veterinary parasitology 140: 69-75.

Dubey J. P. 2002. A review of toxoplasmosis in wild birds. Veterinary parasitology 106: 121-153.

Dubey J. P. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of Toxoplasma gondii from infected tissues. Veterinary parasitology 74: 75-77.

Dubey J. P. 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of Toxoplasma gondii. The Journal of eukaryotic microbiology 44: 592-602.

Dubey J. P., Alvarado-Esquivel C., Herrera-Valenzuela V. H., Ortiz-Diaz J. J., Oliveira S., Verma S. K., Choudhary S., Kwok O. C., Su C. 2013. A new atypical genotype mouse virulent strain of Toxoplasma gondii isolated from the heart of a wild caught puma (Felis concolor) from Durango, Mexico. Veterinary parasitology 197: 674-7

Dubey J. P., Ferreira L. R., Martins J., McLeod R. 2012b. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with Toxoplasma gondii strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. Parasitology. 139: 1-13.

Dubey J. P., Hill D. E., Rozeboom D. W., Rajendran C., Choudhary S., Ferreira L. R., Kwok O. C. and Su C. 2012a. High prevalence and genotypes of Toxoplasma gondii isolated from organic pigs in northern USA. Veterinary parasitology 188: 14-18.

Dubey J. P., Kotula A. W., Sharar A., Andrews C. D. and Lindsay D. S. 1990. Effect of high temperature on infectivity of Toxoplasma gondii tissue cysts in pork. The Journal of parasitology 76: 201-204.

Dubey J. P., Lehmann T., Lautner F., Kwok O. C. and Gamble H. R. 2015. Toxoplasmosis in sentinel chickens (Gallus domesticus) in New England farms: Seroconversion, distribution of tissue cysts in brain, heart, and skeletal muscle by bioassay in mice and cats. Veterinary parasitology .

Dubey J. P., Lindsay D. S. and Speer C. A. 1998. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical microbiology reviews 11: 267-299.

Dubey J. P., Miller N. L. and Frenkel J. K. 1970. The Toxoplasma gondii oocyst from cat feces. The Journal of experimental medicine 132: 636-662.

Dubey J. P., Passos L. M., Rajendran C., Ferreira L. R., Gennari S. M. and Su C. 2011a. Isolation of viable Toxoplasma gondii from feral guinea fowl (Numida meleagris) and domestic rabbits (Oryctolagus cuniculus) from Brazil. The Journal of parasitology 97: 842-845.

Dubey J. P., Velmurugan G. V., Rajendran C., Yabsley M. J., Thomas N. J., Beckmen K. B., Sinnett D., Ruid D., Hart J., Fair P. A., McFee W. E., Shearn-Bochsler V., Kwok O. C., Ferreira L. R., Choudhary S., Faria E. B., Zhou H., Felix T. A. and Su C. 2011b. Genetic characterisation of Toxoplasma gondii in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. International journal for parasitology 41: 1139-1147.

Dufour J. H., Dziejman M., Liu M. T., Leung J. H., Lane T. E. and Luster A. D. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 168: 3195-3204.

Dunn D., Wallon M., Peyron F., Petersen E., Peckham C. and Gilbert R. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. Lancet (London, England) 353: 1829-1833.

Dupont C. D., Christian D. A. and Hunter C. A. 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Seminars in immunopathology 34: 793-813.

Duque T., Souto X., Viana de Andrade-Neto V., Ennes-Vidal V. and Menna-Barreto R. 2013. Chapter14 : Autophagic Balance Between Mammals and Protozoa: A Molecular, Biochemical and Morphological Review of Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections. In Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?, Yannick Bailly (ed.).

Dzierszinski F., Mortuaire M., Cesbron-Delauw M. F. and Tomavo S. 2000. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in Toxoplasma gondii decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. Molecular microbiology 37: 574-582.

Elbez-Rubinstein A., Ajzenberg D., Darde M. L., Cohen R., Dumetre A., Yera H., Gondon E., Janaud J. C. and Thulliez P. 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. The Journal of infectious diseases 199: 280-285.

Elfahal A. M., Elhassan A. M., Hussien M. O., Enan K. A., Musa A. B. and El Hussein A. M. 2013. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in Dairy Cattle with Reproductive Problems in Sudan. ISRN veterinary science 2013: 895165.

Elmore S. A., Jones J. L., Conrad P. A., Patton S., Lindsay D. S. and Dubey J. P. 2010. Toxoplasma gondii: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends in parasitology 26: 190-196.

El-Nawawi F. A., Tawfik M. A. and Shaapan R. M. 2008. Methods for inactivation of Toxoplasma gondii cysts in meat and tissues of experimentally infected sheep. Foodborne pathogens and disease 5: 687-690.

Esmerini P. O., Gennari S. M. and Pena H. F. 2010. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, Sao Paulo state, Brazil, for Toxoplasma gondii. Veterinary parasitology 170: 8-13.

Esteves F., Aguiar D., Rosado J., Costa M. L., de Sousa B., Antunes F. and Matos O. 2014. Toxoplasma gondii prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. Veterinary parasitology 200: 8-12.

Etheridge R. D., Alaganan A., Tang K., Lou H. J., Turk B. E., Sibley L. D. 2014. The Toxoplasma pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. Cell Host and Microbe. 15: 537-50.

Fayer R., Dubey J. P. and Lindsay D. S. 2004. Zoonotic protozoa: from land to sea. Trends in parasitology 20: 531-536.

Feitosa T. F., Vilela V. L., de Melo L. R., de Almeida Neto J. L., Souto D. V., de Morais D. F., Athayde A. C., Azevedo S. S. and Pena H. F. 2014. Toxoplasma gondii and Neospora caninum in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. Veterinary parasitology 202: 305-309.

Fekkar A., Ajzenberg D., Bodaghi B., Touafek F., Le Hoang P., Delmas J., Robert P. Y., Darde M. L., Mazier D. and Paris L. 2011. Direct genotyping of Toxoplasma gondii in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. Journal of clinical microbiology 49: 1513-1517.

Feng P., Park J., Lee B. S., Lee S. H., Bram R. J. and Jung J. U. 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mitochondrial K7 protein targets a cellular calcium-modulating cyclophilin ligand to modulate intracellular calcium concentration and inhibit apoptosis. Journal of virology 76: 11491-11504.

Fentress S. J., Behnke M. S., Dunay I. R., Mashayekhi M., Rommereim L. M., Fox B. A., Bzik D. J., Taylor G. A., Turk B. E., Lichti C. F., Townsend R. R., Qiu W., Hui R., Beatty W. L. and Sibley L. D. 2010. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a Toxoplasma gondii-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. Cell host & microbe 8: 484-495.

Fernandez C., Jaimes J., Ortiz M. C. and Ramirez J. D. 2016. Host and Toxoplasma gondii genetic and non-genetic factors influencing the development of ocular toxoplasmosis: A systematic review. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 44: 199-209.

Filisetti D., Candolfi E. 2004. Immune response to Toxoplasma gondii. Annali dell'Istituto superiore di sanità Istituto superiore di sanità (Italy) 40: 71-80.

Flegr J. and Horacek J. 2018. Toxoplasmosis, but not borreliosis, is associated with psychiatric disorders and symptoms. Schizophrenia research .

Flegr J., Prandota J., Sovickova M. and Israili Z. H. 2014. Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. PloS one 9: e90203.

Forman D., West N., Francis J. and Guy E. 2009. The sero-prevalence of Toxoplasma gondii in British marine mammals. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 104: 296-298.

Fossiez F., Djossou O., Chomarat P., Flores-Romo L., Ait-Yahia S., Maat C., Pin J. J., Garrone P., Garcia E., Saeland S., Blanchard D., Gaillard C., Das Mahapatra B., Rouvier E., Golstein P., Banchereau J. and Lebecque S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. The Journal of experimental medicine 183: 2593-2603.

Foth B. J. and McFadden G. I. 2003. The apicoplast: a plastid in Plasmodium falciparum and other Apicomplexan parasites. International review of cytology 224: 57-110.

Fox B. A., Rommereim L. M., Guevara R. B., Falla A., Hortua Triana M. A., Sun Y. and Bzik D. J. 2016. The Toxoplasma gondii Rhoptry Kinome Is Essential for Chronic Infection. mBio 7: 10.1128/mBio.00193-16.

Francisco-Cruz A., Aguilar-Santelises M., Ramos-Espinosa O., Mata-Espinosa D., Marquina-Castillo B., Barrios-Payan J. and Hernandez-Pando R. 2014. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. Medical oncology (Northwood, London, England) 31: 774-013-0774-6. Epub 2013 Nov 22.

Franco-Hernandez E. N., Acosta A., Cortes-Vecino J. and Gomez-Marin J. E. 2015. Survey for Toxoplasma gondii by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. Parasitology research .

Frenkel J. K., Dubey J. P. and Miller M. L. 1969. Toxoplasma gondii: fecal forms separated from eggs of nematodes Toxocara cati. Science 164: 432-433.

Frenkel J. K. and Dubey J. P. 1973. Effects of freezing on the viability of toxoplasma oocysts. The Journal of parasitology 59: 587-588.

Frenkel J. K., Ruiz A. and Chinchilla M. 1975. Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24: 439-443.

Fritz H. M., Bowyer P. W., Bogyo M., Conrad P. A. and Boothroyd J. C. 2012. Proteomic analysis of fractionated Toxoplasma oocysts reveals clues to their environmental resistance. PloS one 7: e29955.

Fulton R. J., McDade R. L., Smith P. L., Kienker L. J. and Kettman J. R.,Jr. 1997. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. Clinical chemistry 43: 1749-1756.

Garcia-Bocanegra I., Cabezon O., Hernandez E., Martinez-Cruz M. S., Martinez-Moreno A. and Martinez-Moreno J. 2013. Toxoplasma gondii in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. The Journal of parasitology 99: 438-440.

Gay-Andrieu F., Marty P., Pialat J., Sournies G., Drier de Laforte T. and Peyron F. 2003. Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. Prenatal diagnosis 23: 558-560.

Gazzinelli R. T. and Denkers E. Y. 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nature reviews.Immunology 6: 895-906.

Gazzonis A. L., Veronesi F., Di Cerbo A. R., Zanzani S. A., Molineri G., Moretta I., Moretti A., Piergili Fioretti D., Invernizzi A. and Manfredi M. T. 2015. Toxoplasma gondii in small ruminants in Northern Italy - prevalence and risk factors. Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM 22: 62-68.

Gebremedhin E. Z., Agonafir A., Tessema T. S., Tilahun G., Medhin G., Vitale M. and Di Marco V. 2013a. Some risk factors for reproductive failures and contribution of Toxoplasma gondii infection in sheep and goats of Central Ethiopia: a cross-sectional study. Research in veterinary science 95: 894-900.

Gebremedhin E. Z., Agonafir A., Tessema T. S., Tilahun G., Medhin G., Vitale M., Di Marco V., Cox E., Vercruysse J. and Dorny P. 2013b. Seroepidemiological study of ovine toxoplasmosis in East and West Shewa Zones of Oromia Regional State, Central Ethiopia. BMC veterinary research 9: 117-6148-9-117.

Gebremedhin E. Z., Tesfamaryam G., Duguma R., Tilahun G., Di Marco V. and Vitale M. 2014. Majority of T. gondii seropositive chickens (Gallus domesticus) in Central Ethiopia carries the infective parasite. Acta Veterinaria Scandinavica 56: 60-014-0060-4.

Gennari S. M., Ogrzewalska M., Soares H. S., Saraiva D. G., Pinter A., Labruna M. B. and Dubey J. P. 2014. Occurrence of Toxoplasma gondii antibodies in birds from the Atlantic Forest, state of Sao Paulo, Brazil. Veterinary parasitology 200: 193-197.

Gilot-Fromont E., Aubert D., Belkilani S., Hermitte P., Gibout O., Geers R. and Villena I. 2009. Landscape, herd management and within-herd seroprevalence of Toxoplasma gondii in beef cattle herds from Champagne-Ardenne, France. Veterinary parasitology 161: 36-40.

Gotteland C., Gilot-Fromont E., Aubert D., Poulle M. L., Dupuis E., Dardé M. L., Forin-Wiart M. A., Rabilloud M., Riche B., Villena I. 2014. Spatial distribution of Toxoplasma gondii oocysts in soil in a rural area: Influence of cats and land use. Vet Parasitol. 205(3-4):629-37.

Gouy M., Guindon S. and Gascuel O. 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular biology and evolution 27: 221-224.

Goyette S., Cao Z., Libman M., Ndao M. and Ward B. J. 2014. Seroprevalence of parasitic zoonoses and their relationship with social factors among the Canadian Inuit in Arctic regions. Diagnostic microbiology and infectious disease 78: 404-410.

Granel B., Chevillard C. and Dessein A. 2007. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor involvement in systemic sclerosis. La Revue de medecine interne 28: 613-622.

Grigg M. E., Bonnefoy S., Hehl A. B., Suzuki Y. and Boothroyd J. C. 2001. Success and virulence in Toxoplasma as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science (New York, N.Y.) 294: 161-165.

Grigg M. E. and Boothroyd J. C. 2001. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen Toxoplasma gondii by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. Journal of clinical microbiology 39: 398-400.

Grigg M. E. and Suzuki Y. 2003. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in Toxoplasma. Microbes and Infection 5: 685-690.

Gross U., Kempf M. C., Seeber F., Luder C. G., Lugert R. and Bohne W. 1997. Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite? Behring Institute Mitteilungen (99): 97-106.

Guimaraes L. A., Bezerra R. A., Rocha Dde S. and Albuquerque G. R. 2013. Prevalence and risk factors associated with anti-Toxoplasma gondii antibodies in sheep from Bahia state, Brazil. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria 22: 220-224.

Guiton R., Zagani R. and Dimier-Poisson I. 2009. Major role for CD8 T cells in the protection against Toxoplasma gondii following dendritic cell vaccination. Parasite immunology 31: 631-640.

Gutierrez-Fernandez J., Luna Del Castillo Jde D., Mananes-Gonzalez S., Carrillo-Avila J. A., Gutierrez B., Cervilla J. A. and Sorlozano-Puerto A. 2015. Different presence of Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus type 1, human herpes virus 6, and Toxoplasma gondii in schizophrenia: meta-analysis and analytical study. Neuropsychiatric disease and treatment 11: 843-852.

Halova D., Mulcahy G., Rafter P., Turcekova L., Grant T. and de Waal T. 2013. Toxoplasma gondii in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. Zoonoses and public health 60: 168-173.

Hamidinejat H., Nabavi L., Mayahi M., Ghourbanpoor M., Pourmehdi Borojeni M., Norollahi Fard S. and Shokrollahi M. 2014. Comparison of three diagnostic methods for the detection of Toxoplasma gondii in free range chickens. Tropical biomedicine 31: 507-513.

Hamilton C. M., Katzer F., Innes E. A. and Kelly P. J. 2014. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in small ruminants from four Caribbean islands. Parasites & vectors 7: 449-3305-7-449.

Harrington L. E., Hatton R. D., Mangan P. R., Turner H., Murphy T. L., Murphy K. M. and Weaver C. T. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nature immunology 6: 1123-1132.

Heaslip A. T., Ems-McClung S. C. and Hu K. 2009. TgICMAP1 is a novel microtubule binding protein in Toxoplasma gondii. PloS one 4: e7406.

Hecker Y. P., Moore D. P., Manazza J. A., Unzaga J. M., Spath E. J., Pardini L. L., Venturini M. C., Roberi J. L. and Campero C. M. 2013. First report of seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in dairy sheep from Humid Pampa, Argentina. Tropical animal health and production 45: 1645-1647.

Heinrich P. C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F. and Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. The Biochemical journal 334 (Pt 2): 297-314.

Hernandez M., Gomez-Laguna J., Tarradas C., Luque I., Garcia-Valverde R., Reguillo L. and Astorga R. J. 2014. A serological survey of Brucella spp., Salmonella spp., Toxoplasma gondii and Trichinella spp. in Iberian fattening pigs reared in free-range systems. Transboundary and emerging diseases 61: 477-481.

Hill D. E., Dubey J. P., Baroch J. A., Swafford S. R., Fournet V. F., Hawkins-Cooper D., Pyburn D. G., Schmit B. S., Gamble H. R., Pedersen K., Ferreira L. R., Verma S. K., Ying Y., Kwok O. C., Feidas H. and Theodoropoulos G. 2014. Surveillance of feral swine for Trichinella spp. and Toxoplasma gondii in the USA and host-related factors associated with infection. Veterinary parasitology 205: 653-665.

Holec-Gasior L., Drapala D., Dominiak-Gorski B. and Kur J. 2013. Epidemiological study of Toxoplasma gondii infection among cattle in Northern Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM 20: 653-656.

Homan W. L., Vercammen M., De Braekeleer J. and Verschueren H. 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR. International journal for parasitology 30: 69-75.

Howe D. K. and Sibley L. D. 1995. Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. The Journal of infectious diseases 172: 1561-1566.

Howe D. K., Summers B. C. and Sibley L. D. 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in Toxoplasma gondii. Infection and immunity 64: 5193-5198.

Hu K., Johnson J., Florens L., Fraunholz M., Suravajjala S., DiLullo C., Yates J., Roos D. S. and Murray J. M. 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of Toxoplasma gondii. PLoS pathogens 2: e13.

Humphreys N. E., Xu D., Hepworth M. R., Liew F. Y. and Grencis R. K. 2008. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 180: 2443-2449.

Hutchison W. M. 1965. Experimental transmission of Toxoplasma gondii. Nature 206: 961-962.

Hutchison W. M. 1967. The nematode transmission of Toxoplasma gondii. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 61: 80-89.

Ibrahim H. M., Nishimura M., Tanaka S., Awadin W., Furuoka H., Xuan X. and Nishikawa Y. 2014. Overproduction of Toxoplasma gondii cyclophilin-18 regulates host cell migration and enhances parasite dissemination in a CCR5-independent manner. BMC microbiology 14: 76-2180-14-76.

Ibrahim H. M., Xuan X. and Nishikawa Y. 2010. Toxoplasma gondii cyclophilin 18 regulates the proliferation and migration of murine macrophages and spleen cells. Clinical and vaccine immunology : CVI 17: 1322-1329.

Ichikawa-Seki M., Guswanto A., Allamanda P., Mariamah E. S., Wibowo P. E., Igarashi I. and Nishikawa Y. 2015. Seroprevalence of antibody to TgGRA7 antigen of Toxoplasma gondii in livestock animals from Western Java, Indonesia. Parasitology international 64: 484-486.

Iida N. and Grotendorst G. R. 1990. Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. Molecular and cellular biology 10: 5596-5599.

Iovu A., Gyorke A., Mircean V., Gavrea R. and Cozma V. 2012. Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in dairy goats from Romania. Veterinary parasitology 186: 470-474.

Iqbal J., Al-Awadhi M. A. and Raghupathy R. G. 2016. TGF-beta1 levels and intraocular tissue alterations in mice infected with a virulent type I RH Toxoplasma gondii strain. Experimental parasitology 162: 57-63.

Jacquet A., Coulon L., De Neve J., Daminet V., Haumont M., Garcia L., Bollen A., Jurado M. and Biemans R. 2001. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of Toxoplasma gondii to cell-surface proteoglycans. Molecular and biochemical parasitology 116: 35-44.

Janku J. 1923. Pathogenesa a pathologickà anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu zluté skvrny v oku normàlnne velikem a mikrophtalmickém s nàlazem parasitù v sitnici. Casopis Lékaruv Ceskych 62: 1021-1027.

Jensen K. D., Camejo A., Melo M. B., Cordeiro C., Julien L., Grotenbreg G. M., Frickel E. M., Ploegh H. L., Young L., Saeij J. P. 2015. Toxoplasma gondii superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. MBio. 6: e02280.

Jewett T. J. and Sibley L. D. 2003. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. Molecular cell 11: 885-894.

Jia L. and Wu C. 2014. Differentiation, regulation and function of Th9 cells. Advances in Experimental Medicine and Biology 841: 181-207.

Jiang H. H., Huang S. Y., Zhou D. H., Zhang X. X., Su C., Deng S. Z. and Zhu X. Q. 2013. Genetic characterization of Toxoplasma gondii from pigs from different localities in China by PCR-RFLP. Parasites & vectors 6: 227-3305-6-227.

Jiang H. H., Zhang W. B., Zhao L., Zhou D. H., Song H. Q., Xu C. M., Deng S. Z. and Zhu X. Q. 2014. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in pigs in Jiangxi Province, Southeastern China. Foodborne pathogens and disease 11: 362-365.

Johnson W. E., Eizirik E., Pecon-Slattery J., Murphy W. J., Antunes A., Teeling E., O'Brien S. J. 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. Science. 311(5757) :73-7

Jokelainen P., Nareaho A., Halli O., Heinonen M. and Sukura A. 2012. Farmed wild boars exposed to Toxoplasma gondii and Trichinella spp. Veterinary parasitology 187: 323-327.

Jokelainen P., Nareaho A., Knaapi S., Oksanen A., Rikula U. and Sukura A. 2010. Toxoplasma gondii in wild cervids and sheep in Finland: north-south gradient in seroprevalence. Veterinary parasitology 171: 331-336.

Jongert E., Lemiere A., Van Ginderachter J., De Craeye S., Huygen K. and D'Souza S. 2010. Functional characterization of in vivo effector CD4(+) and CD8(+) T cell responses in acute Toxoplasmosis: an interplay of IFN-gamma and cytolytic T cells. Vaccine 28: 2556-2564.

Kantzoura V., Diakou A., Kouam M. K., Feidas H., Theodoropoulou H. and Theodoropoulos G. 2013. Seroprevalence and risk factors associated with zoonotic parasitic infections in small ruminants in the Greek temperate environment. Parasitology international 62: 554-560.

Kasper L., Courret N., Darche S., Luangsay S., Mennechet F., Minns L., Rachinel N., Ronet C. and Buzoni-Gatel D. 2004. Toxoplasma gondii and mucosal immunity. International journal for parasitology 34: 401-409.

Katzer F., Brulisauer F., Collantes-Fernandez E., Bartley P. M., Burrells A., Gunn G., Maley S. W., Cousens C. and Innes E. A. 2011. Increased Toxoplasma gondii positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. Veterinary research 42: 121-9716-42-121.

Keeley A. and Soldati D. 2004. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. Trends in cell biology 14: 528-532.

Khan A., Ajzenberg D., Mercier A., Demar M., Simon S., Darde M. L., Wang Q., Verma S. K., Rosenthal B. M., Dubey J. P. and Sibley L. D. 2014. Geographic separation of domestic and wild strains of Toxoplasma gondii in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosome1a. PLoS neglected tropical diseases 8: e3182.

Khan A., Bohme U., Kelly K. A., Adlem E., Brooks K., Simmonds M., Mungall K., Quail M. A., Arrowsmith C., Chillingworth T., Churcher C., Harris D., Collins M., Fosker N., Fraser A., Hance Z., Jagels K., Moule S., Murphy L., O'Neil S., Rajandream M. A., Saunders D., Seeger K., Whitehead S., Mayr T., Xuan X., Watanabe J., Suzuki Y., Wakaguri H., Sugano S., Sugimoto C., Paulsen I., Mackey A. J., Roos D. S., Hall N., Berriman M., Barrell B., Sibley L. D. and Ajioka J. W. 2006. Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of Toxoplasma gondii. Genome research 16: 1119-1125.

Khan A., Dubey J. P., Su C., Ajioka J. W., Rosenthal B. M. and Sibley L. D. 2011. Genetic analyses of atypical Toxoplasma gondii strains reveal a fourth clonal lineage in North America. International journal for parasitology 41: 645-655.

Khan A., Fux B., Su C., Dubey J. P., Darde M. L., Ajioka J. W., Rosenthal B. M. and Sibley L. D. 2007. Recent transcontinental sweep of Toxoplasma gondii driven by a single monomorphic chromosome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 14872-14877.

Khan A., Jordan C., Muccioli C., Vallochi A. L., Rizzo L. V., Belfort R.,Jr, Vitor R. W., Silveira C. and Sibley L. D. 2006. Genetic divergence of Toxoplasma gondii strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. Emerging infectious diseases 12: 942-949.

Khan A., Miller N., Roos D. S., Dubey J. P., Ajzenberg D., Darde M. L., Ajioka J. W., Rosenthal B. and Sibley L. D. 2011. A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of Toxoplasma gondii. mBio 2: e00228-11.

Khan A., Taylor S., Su C., Mackey A. J., Boyle J., Cole R., Glover D., Tang K., Paulsen I. T., Berriman M., Boothroyd J. C., Pfefferkorn E. R., Dubey J. P., Ajioka J. W., Roos D. S., Wootton J. C. and Sibley L. D. 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of Toxoplasma gondii. Nucleic acids research 33: 2980-2992.

Kodaman N., Pazos A., Schneider B. G., Piazuelo M. B., Mera R., Sobota R. S., Sicinschi L. A., Shaffer C. L., Romero-Gallo J., de Sablet T., Harder R. H., Bravo L. E., Peek R. M. Jr, Wilson K. T., Cover T. L., Williams S. M., Correa P. 2014. Human and Helicobacter pylori coevolution shapes the risk of gastric disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(4): 1455-60.

Koh H. J., Kim Y. R., Kim J. S., Yun J. S., Jang K. and Yang C. S. 2017. Toxoplasma gondii GRA7-Targeted ASC and PLD1 Promote Antibacterial Host Defense via PKCalpha. PLoS pathogens 13: e1006126.

Kroncke R., Loppnow H., Flad H. D. and Gerdes J. 1996. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. European journal of immunology 26: 2541-2544.

Kuticic V. and Wikerhauser T. 1996. Studies of the effect of various treatments on the viability of Toxoplasma gondii tissue cysts and oocysts. Current topics in microbiology and immunology 219: 261-265.

Lanjewar D. N., Agale S. V., Chitale A. R. and Joshi S. R. 2006. Sudden death due to cardiac toxoplasmosis. The Journal of the Association of Physicians of India 54: 244-245.

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. and Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics (Oxford, England) 23: 2947-2948.

Leblebicier A. and Yildiz K. 2014. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in sheep in Silopi district by using indirect fluorescent antibody test (IFAT). Turkiye parazitolojii dergisi / Turkiye Parazitoloji Dernegi = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology 38: 1-4.

Legay J. M. 1986. Tentative estimation of the total number of domestic cats in the world. Comptes rendus de l'Academie des sciences.Serie III, Sciences de la vie 303: 709-712.

Lehmann T., Marcet P. L., Graham D. H., Dahl E. R. and Dubey J. P. 2006. Globalization and the population structure of Toxoplasma gondii. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 11423-11428.

Lei T., Wang H., Liu J., Nan H. and Liu Q. 2014. ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between Toxoplasma gondii and Neospora caninum. PloS one 9: e99744.

Lekutis C., Ferguson D. J., Grigg M. E., Camps M. and Boothroyd J. C. 2001. Surface antigens of Toxoplasma gondii: variations on a theme. International journal for parasitology 31: 1285-1292.

Leport C., Ambroise-Thomas P., Bazin C., Chene G., Derouin F., Katlama C., Mayaud C., Pelloux H., Raffi F. and Vilde J. L. 1996. Risk factors of cerebral toxoplasmosis in patients with HIV infection. Definition of indications of primary prevention. Annales de Medecine Interne 147: 331-332.

Li M., Mo X. W., Wang L., Chen H., Luo Q. L., Wen H. Q., Wei W., Zhang A. M., Du J., Lu F. L., Lun Z. R. and Shen J. L. 2014. Phylogeny and virulence divergency analyses of Toxoplasma gondii isolates from China. Parasites & vectors 7: 133-3305-7-133.

Li Z., Zhao Z. J., Zhu X. Q., Ren Q. S., Nie F. F., Gao J. M., Gao X. J., Yang T. B., Zhou W. L., Shen J. L., Wang Y., Lu F. L., Chen X. G., Hide G., Ayala F. J. and Lun Z. R. 2012. Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against T. gondii infection. PloS one 7: e35834.

Liao W., Lin J. X. and Leonard W. J. 2011. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. Current opinion in immunology 23: 598-604.

Lin J., Lin X., Yang G. H., Wang Y., Peng B. W. and Lin J. Y. 2010. Toxoplasma gondii: expression of GRA1 gene in endoplasmic reticulum promotes both growth and adherence and modulates intracellular calcium release in macrophages. Experimental parasitology 125: 165-171.

Lindsay D. S. and Dubey J. P. 2009. Long-term survival of Toxoplasma gondii sporulated oocysts in seawater. The Journal of parasitology 95: 1019-1020.

Liu J., Cao S., Kim S., Chung E. Y., Homma Y., Guan X., Jimenez V. and Ma X. 2005. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. Current immunology reviews 1: 119-137.

Long S., Brown K. M., Drewry L. L., Anthony B., Phan I. Q. H. and Sibley L. D. 2017. Calmodulin-like proteins localized to the conoid regulate motility and cell invasion by Toxoplasma gondii. PLoS pathogens 13: e1006379.

Lopes A. P., Dubey J. P., Neto F., Rodrigues A., Martins T., Rodrigues M. and Cardoso L. 2013. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. Veterinary parasitology 193: 266-269.

Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, Karamycheva S, Pinney D, Brunk BP, Ajioka JW, Ajzenberg D, Boothroyd JC, Boyle JP, Dardé ML, Diaz-Miranda MA, Dubey JP, Fritz HM, Gennari SM, Gregory BD, Kim K, Saeij JP, Su C, White MW, Zhu XQ, Howe DK, Rosenthal BM, Grigg ME, Parkinson J, Liu L, Kissinger JC, Roos DS, Sibley LD. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic Toxoplasma gondii genomes. Nat Commun. 2016 Jan 7;7:10147.

Loss S. R., Will T. and Marra P. P. 2013. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. Nature communications 4: 1396.

Luo F., Zheng L., Hu Y., Liu S., Wang Y., Xiong Z., Hu X., Tan F. Induction of Protective Immunity against Toxoplasma gondii in Mice by Nucleoside Triphosphate Hydrolase-II (NTPase-II) Self-amplifying RNA Vaccine Encapsulated in Lipid Nanoparticle (LNP). 2017. Front Microbiology 8: 605.

Lynch M., Nielsen O., Duignan P. J., Kirkwood R., Hoskins A. and Arnould J. P. 2011. Serologic survey for potential pathogens and assessment of disease risk in Australian fur seals. Journal of wildlife diseases 47: 555-565.

Lyons R. E., McLeod R. and Roberts C. W. 2002. Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion. Trends in parasitology 18: 198-201.

Maenz M., Schluter D., Liesenfeld O., Schares G., Gross U. and Pleyer U. 2014. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. Progress in retinal and eye research 39: 77-106.

Mann T. and Beckers C. 2001. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite Toxoplasma gondii. Molecular and biochemical parasitology 115: 257-268.

March C. J., Mosley B., Larsen A., Cerretti D. P., Braedt G., Price V., Gillis S., Henney C. S., Kronheim S. R. and Grabstein K. 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature 315: 641-647.

Markovic M., Ivovic V., Stajner T., Djokic V., Klun I., Bobic B., Nikolic A. and Djurkovic-Djakovic O. 2014. Evidence for genetic diversity of Toxoplasma gondii in selected intermediate hosts in Serbia. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 37: 173-179.

Martinez-Hernandez F., Jimenez-Gonzalez D. E., Chenillo P., Alonso-Fernandez C., Maravilla P., Flisser A. 2009. Geographical widespread of two lineages of Taenia solium due to human migrations: can population genetic analysis strengthen this hypothesis? Infect Genet Evol. 9(6): 1108-14.

Matsuo K., Kamai R., Uetsu H., Goto H., Takashima Y. and Nagamune K. 2014. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan. Parasitology international 63: 638-639.

Maubon D., Bougdour A., Wong Y. S., Brenier-Pinchart M. P., Curt A., Hakimi M. A. and Pelloux H. 2010. Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on Toxoplasma gondii: inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54: 4843-4850.

Maurer M. and von Stebut E. 2004. Macrophage inflammatory protein-1. The international journal of biochemistry & cell biology 36: 1882-1886.

Mazzillo F. F., Shapiro K. and Silver M. W. 2013. A new pathogen transmission mechanism in the ocean: the case of sea otter exposure to the land-parasite Toxoplasma gondii. PloS one 8: e82477.

McAuley J. B. 2014. Congenital Toxoplasmosis. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society 3: S30-S35.

Meissner M., Schluter D. and Soldati D. 2002. Role of Toxoplasma gondii myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. Science (New York, N.Y.) 298: 837-840.

Mennechet F. J., Kasper L. H., Rachinel N., Minns L. A., Luangsay S., Vandewalle A. and Buzoni-Gatel D. 2004. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. European journal of immunology 34: 1059-1067.

Mercier A., Ajzenberg D., Devillard S., Demar M. P., de Thoisy B., Bonnabau H., Collinet F., Boukhari R., Blanchet D., Simon S., Carme B. and Darde M. L. 2011. Human impact on genetic diversity of Toxoplasma gondii: example of the anthropized environment from French Guiana. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 11: 1378-1387.

Mercier A., Devillard S., Ngoubangoye B., Bonnabau H., Banuls A. L., Durand P., Salle B., Ajzenberg D. and Darde M. L. 2010. Additional haplogroups of Toxoplasma gondii out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. PLoS neglected tropical diseases 4: e876.

Mercier C., Cesbron-Delauw M. F. Toxoplasma secretory granules: one population or more? Trends Parasitology. 2015 Feb;31(2):60-71.

Mercier C., Dubremetz J. F., Rauscher B., Lecordier L., Sibley L. D. and Cesbron-Delauw M. F. 2002. Biogenesis of nanotubular network in Toxoplasma parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. Molecular biology of the cell 13: 2397-2409.

Messier V., Levesque B., Proulx J. F., Rochette L., Libman M. D., Ward B. J., Serhir B., Couillard M., Ogden N. H., Dewailly E., Hubert B., Dery S., Barthe C., Murphy D. and Dixon B. 2009. Seroprevalence of Toxoplasma gondii among Nunavik Inuit (Canada). Zoonoses and public health 56: 188-197.

Michael S. A., Howe L., Chilvers B. L., Morel P. and Roe W. D. 2016. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in mainland and sub-Antarctic New Zealand sea lion (Phocarctos hookeri) populations. New Zealand veterinary journal 64: 293-297.

Miller C. M., Boulter N. R., Ikin R. J. and Smith N. C. 2009. The immunobiology of the innate response to Toxoplasma gondii. International journal for parasitology 39: 23-39.

Miller M. A., Grigg M. E., Kreuder C., James E. R., Melli A. C., Crosbie P. R., Jessup D. A., Boothroyd J. C., Brownstein D. and Conrad P. A. 2004. An unusual genotype of Toxoplasma gondii is common in California sea otters (Enhydra lutris nereis) and is a cause of mortality. International journal for parasitology 34: 275-284.

Minot S., Melo M. B., Li F., Lu D., Niedelman W., Levine S. S., Saeij J. P. Admixture and recombination among Toxoplasma gondii lineages explain global genome diversity. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109: 13458-63.

Moncada P. A. and Montoya J. G. 2012. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. Expert review of anti-infective therapy 10: 815-828.

Mordue D. G., Monroy F., La Regina M., Dinarello C. A., Sibley L. D. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. The Journal of Immunology. 167: 4574-84.

Mosser D. M. and Zhang X. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunological reviews 226: 205-218.

Müller U. B., Howard J. C. 2016. The impact of Toxoplasma gondii on the mammalian genome. Curr Opin Microbiol. 32: 19-25.

Munoz-Zanzi C., Tamayo R., Balboa J. and Hill D. 2012. Detection of oocyst-associated toxoplasmosis in swine from southern Chile. Zoonoses and public health 59: 389-392.

Murray L., Mobegi V. A., Duffy C. W., Assefa S. A., Kwiatkowski D. P., Laman E., Loua K. M. and Conway D. J. 2016. Microsatellite genotyping and genome-wide single nucleotide polymorphism-based indices of Plasmodium falciparum diversity within clinical infections. Malaria journal 15: 275-016-1324-4.

Nachman M. W. 2001. Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. Trends in genetics : TIG 17: 481-485.

Nagamune K., Moreno S. N., Chini E. N. and Sibley L. D. 2008. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. Sub-cellular biochemistry 47: 70-81.

Nam H. W. 2009. GRA proteins of Toxoplasma gondii: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. The Korean journal of parasitology 47 Suppl: S29-37.

Nguyen K. B., Salazar-Mather T. P., Dalod M. Y., Van Deusen J. B., Wei X. Q., Liew F. Y., Caligiuri M. A., Durbin J. E. and Biron C. A. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 169: 4279-4287.

Nguyen T. D., Bigaignon G., Markine-Goriaynoff D., Heremans H., Nguyen T. N., Warnier G., Delmee M., Warny M., Wolf S. F., Uyttenhove C., Van Snick J., Coutelier J. P. 2003. Virulent Toxoplasma gondii strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. Journal of Medical Microbiology 52: 869-76.

Nieberding C. M., Olivieri I. 2007. Parasites: proxies for host genealogy and ecology? Trends in Ecology & Evolution 22: 156-65.

Nicolle C. and Manceaux L. 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. 148: 368-372.

Nicolle C. and Manceaux L. 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. 147: 763-767.

Niedelman W., Gold D. A., Rosowski E. E., Sprokholt J. K., Lim D., Farid Arenas A., Melo M. B., Spooner E., Yaffe M. B. and Saeij J. P. 2012. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate Toxoplasma gondii evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. PLoS pathogens 8: e1002784.

Olias P. and Sibley L. D. 2016. Functional Analysis of the Role of Toxoplasma gondii Nucleoside Triphosphate Hydrolases I and II in Acute Mouse Virulence and Immune Suppression. Infection and immunity 84: 1994-2001.

Onyiche T. E. and Ademola I. O. 2015. Seroprevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in cattle and pigs in Ibadan, Nigeria. Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology 39: 309-314.

Opitz C. and Soldati D. 2002. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by Toxoplasma gondii. Molecular microbiology 45: 597-604.

Ozgonul C. and Besirli C. G. 2016. Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. Ophthalmic research .

Pastiu A. I., Gyorke A., Blaga R., Mircean V., Rosenthal B. M. and Cozma V. 2013. In Romania, exposure to Toxoplasma gondii occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. Parasitology research 112: 2403-2407.

Peixoto L., Chen F., Harb O. S., Davis P. H., Beiting D. P., Brownback C. S., Ouloguem D. and Roos D. S. 2010. Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. Cell host & microbe 8: 208-218.

Pereira-Chioccola V. L., Vidal J. E. and Su C. 2009. Toxoplasma gondii infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. Future microbiology 4: 1363-1379.

Pinkerton H. and Weinman D. 1940. Toxoplasma infection in man. Arch. Pathol 30: 374-392.

Pleyer U., Schluter D. and Manz M. 2014. Ocular toxoplasmosis: recent aspects of pathophysiology and clinical implications. Ophthalmic research 52: 116-123.

Pollard A. M., Onatolu K. N., Hiller L., Haldar K. and Knoll L. J. 2008. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in Toxoplasma gondii. Infection and immunity 76: 103-110.

Pomares C., Ajzenberg D., Bornard L., Bernardin G., Hasseine L., Darde M. L. and Marty P. 2011. Toxoplasmosis and horse meat, France. Emerging infectious diseases 17: 1327-1328.

Pomares C., Devillard S., Holmes T. H., Olariu T. R., Press C. J., Ramirez R., Talucod J., Estran R., Su C., Dubey J. P., Ajzenberg D. and Montoya J. G. 2018. Genetic characterization of Toxoplama gondii DNA samples isolated from humans living in North America: An unexpected high prevalence of atypical genotypes. The Journal of infectious diseases 218: 1783-1791.

Saraf P., Shwab E. K., Dubey J. P., Su C, 2017. On the determination of Toxoplasma gondii virulence in mice. Experimental Parasitology 174: 25-30.

Pott H.,Jr and Castelo A. 2013. Isolated cerebellar toxoplasmosis as a complication of HIV infection. International Journal of STD & AIDS 24: 70-72.

Qiu J. H., Wang C. R., Zhang X., Sheng Z. H., Chang Q. C., Zhao Q., Wu S. M., Zou F. C. and Zhu X. Q. 2012. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in beef cattle and dairy cattle in northeast China. Foodborne pathogens and disease 9: 579-582.

Quilez J., Vergara-Castiblanco C., Monteagudo L., Del Cacho E. and Sanchez-Acedo C. 2011. Multilocus fragment typing and genetic structure of Cryptosporidium parvum Isolates from diarrheic preweaned calves in Spain. Applied and Environmental Microbiology 77: 7779-7786.

R Development Core team. 2016. The R Project for Statistical Computing. Available from: https://www.r-project.org. .

Rachinel N., Buzoni-Gatel D., Dutta C., Mennechet F. J., Luangsay S., Minns L. A., Grigg M. E., Tomavo S., Boothroyd J. C. and Kasper L. H. 2004. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of Toxoplasma gondii. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 173: 2725-2735.

Rahman M., Azad M. T., Nahar L., Rouf S. M., Ohya K., Chiou S. P., Baba M., Kitoh K. and Takashima Y. 2014. Age-specificity of Toxoplasma gondii seroprevalence in sheep, goats and cattle on subsistence farms in Bangladesh. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 76: 1257-1259.

Ramaprasad A., Mourier T., Naeem R., Malas T. B., Moussa E., Panigrahi A., Vermont S. J., Otto T. D., Wastling J., Pain A. 2015. Comprehensive evaluation of Toxoplasma gondii VEG and Neospora caninum LIV genomes with tachyzoite stage transcriptome and proteome defines novel transcript features. PLoS One 10: e0124473.

Reese M. L., Shah N., Boothroyd J. C. 2014. The Toxoplasma pseudokinase ROP5 is an allosteric inhibitor of the immunity-related GTPases. The Journal of Biological Chemistry 289: 27849-58.

Regidor-Cerrillo J., Diez-Fuertes F., Garcia-Culebras A., Moore D. P., Gonzalez-Warleta M., Cuevas C., Schares G., Katzer F., Pedraza-Diaz S., Mezo M. and Ortega-Mora L. M. 2013. Genetic diversity and geographic population structure of bovine Neospora caninum determined by microsatellite genotyping analysis. PloS one 8: e72678.

Rich J. T., Neely J. G., Paniello R. C., Voelker C. C., Nussenbaum B. and Wang E. W. 2010. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery 143: 331-336.

Rivera-Rivera Y., Garcia Y., Toro V., Cappas N., Lopez P., Yamamura Y. and Rivera-Amill V. 2014. Depression Correlates with Increased Plasma Levels of Inflammatory Cytokines and a Dysregulated Oxidant/Antioxidant Balance in HIV-1-Infected Subjects Undergoing Antiretroviral Therapy. Journal of clinical & cellular immunology 5: 10.4172/2155-9899.1000276.

Robert-Gangneux F., Sterkers Y., Yera H., Accoceberry I., Menotti J., Cassaing S., Brenier-Pinchart M. P., Hennequin C., Delhaes L., Bonhomme J., Villena I., Scherer E., Dalle F., Touafek F., Filisetti D., Varlet-Marie E., Pelloux H. and Bastien P. 2015. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. Journal of clinical microbiology 53: 1677-1684.

Rome M. E., Beck J. R., Turetzky J. M., Webster P. and Bradley P. J. 2008. Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in Toxoplasma gondii. Infection and immunity 76: 4865-4875.

Roqueplo C., Halos L., Cabre O. and Davoust B. 2011. Toxoplasma gondii in wild and domestic animals from New Caledonia. Parasite (Paris, France) 18: 345-348.

Ruffolo B. B., Toledo Rdos S., Martins F. D., Bugni F. M., Costa L., Marana E. R., Navarro I. T., Garcia J. L., Su C. and Freire R. L. 2016. Isolation and genotyping of Toxoplasma gondii in seronegative urban rats and presence on antibodies in communicating dogs in Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 58: 28-9946201658028. Epub 2016 Apr 8.

Ruiz A. and Frenkel J. K. 1980. Intermediate and transport hosts of Toxoplasma gondii in Costa Rica. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29: 1161-1166.

Sabin A. B. 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. Journal of the American Medical Association 116: 801-807.

Sabin A. B. and Feldman H. A. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). Science 108: 660-663.

Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S. C., Kakol J. M., Stein L. D., Marth G., Sherry S., Mullikin J. C., Mortimore B. J., Willey D. L., Hunt S. E., Cole C. G., Coggill P. C., Rice C. M., Ning Z., Rogers J., Bentley D. R., Kwok P. Y., Mardis E. R., Yeh R. T., Schultz B., Cook L., Davenport R., Dante M., Fulton L., Hillier L., Waterston R. H., McPherson J. D., Gilman B., Schaffner S., Van Etten W. J., Reich D., Higgins J., Daly M. J., Blumenstiel B., Baldwin J., Stange-Thomann N., Zody M. C., Linton L., Lander E. S., Altshuler D. and International SNP Map Working Group. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409: 928-933.

Saeij J. P., Boyle J. P. and Boothroyd J. C. 2005. Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the infected host. Trends in parasitology 21: 476-481.

Saeij J. P., Boyle J. P., Grigg M. E., Arrizabalaga G., Boothroyd J. C. 2005. Bioluminescence imaging of Toxoplasma gondii infection in living mice reveals dramatic differences between strains. Infection and Immunity 73: 695-702.

Saeij J. P., Coller S., Boyle J. P., Jerome M. E., White M. W. and Boothroyd J. C. 2007. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. Nature 445: 324-327.

Salant H., Hamburger J., King R. and Baneth G. 2013. Toxoplasma gondii prevalence in Israeli crows and Griffon vultures. Veterinary parasitology 191: 23-28.

Salehi N., Gottstein B. and Haddadzadeh H. R. 2015. Genetic diversity of bovine Neospora caninum determined by microsatellite markers. Parasitology international 64: 357-361.

Salgueiro P., Vicente J. L., Figueiredo R. C. and Pinto J. 2016. Genetic diversity and population structure of Plasmodium falciparum over space and time in an African archipelago. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 43: 252-260.

Sanfelice R. A., Machado L. F., Bosqui L. R., Miranda-Sapla M. M., Tomiotto-Pellissier F., de Alcântara Dalevedo G., Ioris D., Reis G. F., Panagio L. A., Navarro I. T., Bordignon J., Conchon-Costa I., Pavanelli W. R., Almeida R. S., Costa I. N. 2017. Activity of rosuvastatin in tachyzoites of Toxoplasma gondii (RH strain) in HeLa cells. Experimental Parasitology 181: 75-81.

Santos Cde S., de Azevedo S. S., Soares H. S., Higino S. S., Pena H. F., Alves C. J. and Gennari S. M. 2012. Risk factors associated with Toxoplasma gondii seroprevalence in goats in the State of Paraiba, Brazil. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria 21: 399-404.

Santos L. M., Dame M. C., Cademartori B. G., da Cunha Filho N. A., Farias N. A. and Ruas J. L. 2013. Occurrence of antibodies to Toxoplasma gondii in water buffaloes and meat cattle in Rio Grande do Sul State, southern Brazil. Acta parasitologica / Witold Stefanski Institute of Parasitology, Warszawa, Poland 58: 334-336.

Saouros S., Edwards-Jones B., Reiss M., Sawmynaden K., Cota E., Simpson P., Dowse T. J., Jakle U., Ramboarina S., Shivarattan T., Matthews S. and Soldati-Favre D. 2005. A novel galectin-like domain from Toxoplasma gondii micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. The Journal of biological chemistry 280: 38583-38591.

Saraf P., Shwab E. K., Dubey J. P. and Su C. 2017. On the determination of Toxoplasma gondii virulence in mice. Experimental parasitology 174: 25-30.

Sarvi S., Daryani A., Rahimi M. T., Aarabi M., Shokri A., Ahmadpour E., Mizani A. and Sharif M. 2015. Cattle toxoplasmosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. Asian Pacific journal of tropical medicine 8: 120-126.

Sasai M., Pradipta A. and Yamamoto M. 2018. Host immune responses to Toxoplasma gondii. International immunology 30: 113-119.

Schluns K. S., Williams K., Ma A., Zheng X. X. and Lefrancois L. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 168: 4827-4831.

Schoenborn J. R. and Wilson C. B. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Advances in Immunology 96: 41-101.

Scholthof K. B. 2007. The disease triangle: pathogens, the environment and society. Nature Reviews Microbiology 5: 152-6.

Schumacher C., Clark-Lewis I., Baggiolini M. and Moser B. 1992. High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 10542-10546.

Seng S., Yokoyama M., Suzuki R., Maki Y., Kato M., Lim C., Zayatiin B., Inoue N., Xuan X., Igarashi I., Nagasawa H., Fujisaki K., Mikami T., Suzuki N., Toyoda Y. 2000. Expression of SAG-1 of Toxoplasma gondii in transgenic mice. Parasitology Research. 86: 263-9.

Sepulveda-Arias J. C., Gomez-Marin J. E., Bobic B., Naranjo-Galvis C. A. and Djurkovic-Djakovic O. 2014. Toxoplasmosis as a travel risk. Travel medicine and infectious disease 12: 592-601.

Sharif M., Sarvi S., Shokri A., Hosseini Teshnizi S., Rahimi M. T., Mizani A., Ahmadpour E. and Daryani A. 2015. Toxoplasma gondii infection among sheep and goats in Iran: a systematic review and meta-analysis. Parasitology research 114: 1-16.

Shwab E. K., Zhu X. Q., Majumdar D., Pena H. F., Gennari S. M., Dubey J. P. and Su C. 2014. Geographical patterns of Toxoplasma gondii genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. Parasitology 141: 453-461.

Shwab E. K., Saraf P., Zhu X. Q. , Zhou D. H., McFerrin B. M., Ajzenberg D., Schares G., Hammond-Aryee K., van Helden P., Higgins S. A., Gerhold R. W., Rosenthal B. M., Zhao X., Dubey J. P., Su C. 2018. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite Toxoplasma gondii. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 115(29): E6956-E6963.

Sibley L. D. Recent origins among ancient parasites. 2003. Veterinary Parasitology. J. 115(2): 185-98.

Sibley L. D. and Ajioka J. W. 2008. Population structure of Toxoplasma gondii: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. Annual Review of Microbiology 62: 329-351.

Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in Toxoplasma gondii. 2002. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences Royal Society (Great Britain). 357(1417): 81-8

Sibley L. D. and Boothroyd J. C. 1992. Virulent strains of Toxoplasma gondii comprise a single clonal lineage. Nature 359: 82-85.

Silveira C., Muccioli C., Holland G. N., Jones J. L., Yu F., de Paulo A. and Belfort R.,Jr. 2015. Ocular Involvement Following an Epidemic of Toxoplasma gondii Infection in Santa Isabel do Ivai, Brazil. American Journal of Ophthalmology 159: 1013-1021.e3.

Simeone C. A., Gulland F. M., Norris T. and Rowles T. K. 2015. A Systematic Review of Changes in Marine Mammal Health in North America, 1972-2012: The Need for a Novel Integrated Approach. PloS one 10: e0142105.

Simon A., Rousseau A. N., Savary S., Bigras-Poulin M. and Ogden N. H. 2013. Hydrological modelling of Toxoplasma gondii oocysts transport to investigate contaminated snowmelt runoff as a potential source of infection for marine mammals in the Canadian Arctic. Journal of environmental management 127: 150-161.

Skariah S., McIntyre M. K. and Mordue D. G. 2010. Toxoplasma gondii: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. Parasitology research 107: 253-260.

Sobanski V., Ajzenberg D., Delhaes L., Bautin N. and Just N. 2013. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. American journal of respiratory and critical care medicine 187: 1143-1145.

Splendore A. 1908. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kalaazar dell'uoma, Nota preliminare pel. Revista da Sociedade Scientífica de São Paulo 3: 109-112.

Sroka J., Karamon J., Cencek T. and Dutkiewicz J. 2011. Preliminary assessment of usefulness of cELISA test for screening pig and cattle populations for presence of antibodies against Toxoplasma gondii. Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM 18: 335-339.

Steinparzer R., Reisp K., Grunberger B., Kofer J., Schmoll F. and Sattler T. 2015. Comparison of different commercial serological tests for the detection of Toxoplasma gondii antibodies in serum of naturally exposed pigs. Zoonoses and public health 62: 119-124.

Stormoen M., Tharaldsen J. and Hopp P. 2012. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in Norwegian dairy goats. Acta Veterinaria Scandinavica 54: 75-0147-54-75.

Straub K. W., Cheng S. J., Sohn C. S. and Bradley P. J. 2009. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. Cellular microbiology 11: 590-603.

Su C., Evans D., Cole R. H., Kissinger J. C., Ajioka J. W. and Sibley L. D. 2003. Recent expansion of Toxoplasma through enhanced oral transmission. Science (New York, N.Y.) 299: 414-416.

Su C., Khan A., Zhou P., Majumdar D., Ajzenberg D., Darde M. L., Zhu X. Q., Ajioka J. W., Rosenthal B. M., Dubey J. P. and Sibley L. D. 2012. Globally diverse Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109: 5844-5849.

Su C., Zhang X. and Dubey J. P. 2006a. Genotyping of Toxoplasma gondii by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. International journal for parasitology 36: 841-848.

Su C., Zhang X. and Dubey J. P. 2006b. Genotyping of Toxoplasma gondii by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. International journal for parasitology 36: 841-848.

Sun W. W., Meng Q. F., Cong W., Shan X. F., Wang C. F. and Qian A. D. 2015. Herd-level prevalence and associated risk factors for Toxoplasma gondii, Neospora caninum, Chlamydia abortus and bovine viral diarrhoea virus in commercial dairy and beef cattle in eastern, northern and northeastern China. Parasitology research 114: 4211-4218.

Suss-Toby E., Zimmerberg J. and Ward G. E. 1996. Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 8413-8418.

Swai E. S. and Kaaya J. E. 2013. A survey of Toxoplasma gondii antibodies by latex agglutination assay in dairy goats in Northern Tanzania. Tropical animal health and production 45: 211-217.

Tay J., Levesque J. P. and Winkler I. G. 2017. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. International journal of hematology 105: 129-140.

Tenter A. M., Heckeroth A. R. and Weiss L. M. 2000. Toxoplasma gondii: from animals to humans. International journal for parasitology 30: 1217-1258.

Tilley M., Fichera M. E., Jerome M. E., Roos D. S. and White M. W. 1997. Toxoplasma gondii sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. Infection and immunity 65: 4598-4605.

Tinti M., Possenti A., Cherchi S., Barca S. and Spano F. 2003. Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of Toxoplasma gondii. International journal for parasitology 33: 1605-1616.

Tobin C., Pollard A. and Knoll L. 2010. Toxoplasma gondii cyst wall formation in activated bone marrow-derived macrophages and bradyzoite conditions. Journal of visualized experiments : JoVE (42). pii: 2091. doi: 10.3791/2091.

Tomavo S. 2001. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of Toxoplasma gondii: an adaptive developmental strategy. International journal for parasitology 31: 1023-1031.

Torrey E. F., Bartko J. J., Lun Z. R. and Yolken R. H. 2007. Antibodies to Toxoplasma gondii in patients with schizophrenia: a meta-analysis. Schizophrenia bulletin 33: 729-736.

Tourdjman M., Tchéandjieu C., De Valk H., Goulet V. and Le Strat Y. 2015. Toxoplasmosis among pregnant women in France: trends in seroprevalence and associated factors between 1995 and 2010. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire : 264.

Tryland M., Nesbakken T., Robertson L., Grahek-Ogden D. and Lunestad B. T. 2014. Human pathogens in marine mammal meat - a northern perspective. Zoonoses and public health 61: 377-394.

Turcekova L., Antolova D., Reiterova K. and Spisak F. 2013. Occurrence and genetic characterization of Toxoplasma gondii in naturally infected pigs. Acta parasitologica / Witold Stefanski Institute of Parasitology, Warszawa, Poland 58: 361-366.

Tyanova S. and Cox J. 2018. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1711: 133-148.

Tzanidakis N., Maksimov P., Conraths F. J., Kiossis E., Brozos C., Sotiraki S. and Schares G. 2012. Toxoplasma gondii in sheep and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. Veterinary parasitology 190: 340-348.

Velasquez J. N., Ledesma B. A., Nigro M. G., Vittar N., Rueda N., De Carolis L., Figueiras O., Carnevale S. and Corti M. 2016. Pulmonary toxoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected patients in the era of antiretroviral therapy. Lung India : official organ of Indian Chest Society 33: 88-91.

Verhelst D., De Craeye S., Vanrobaeys M., Czaplicki G., Dorny P. and Cox E. 2014. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in domestic sheep in Belgium. Veterinary parasitology 205: 57-61.

Vignali D. A. 2000. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. Journal of immunological methods 243: 243-255.

Vilares A., Gargaté M. J., Ferreira I., Martins S., Gomes J. P. 2017. Molecular and virulence characterization of Toxoplasma gondii strains isolated from humans in Portugal. Parasitology Research 116: 979-985

Vitaliano S. N., Soares H. S., Minervino A. H., Santos A. L., Werther K., Marvulo M. F., Siqueira D. B., Pena H. F., Soares R. M., Su C. and Gennari S. M. 2014. Genetic characterization of Toxoplasma gondii from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. International journal for parasitology.Parasites and wildlife 3: 276-283.

Wajant H., Pfizenmaier K. and Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. Cell death and differentiation 10: 45-65.

Wallace G. D. 1972. Experimental transmission of Toxoplasma gondii by cockroaches. The Journal of infectious diseases 126: 545-547.

Wang H., Wang T., Luo Q., Huo X., Wang L., Liu T., Xu X., Wang Y., Lu F., Lun Z., Yu L. and Shen J. 2012. Prevalence and genotypes of Toxoplasma gondii in pork from retail meat stores in Eastern China. International journal of food microbiology 157: 393-397.

Wang L., Chen H., Liu D., Huo X., Gao J., Song X., Xu X., Huang K., Liu W., Wang Y., Lu F., Lun Z. R., Luo Q., Wang X. and Shen J. 2013a. Genotypes and mouse virulence of Toxoplasma gondii isolates from animals and humans in China. PloS one 8: e53483.

Wang L., Cheng H. W., Huang K. Q., Xu Y. H., Li Y. N., Du J., Yu L., Luo Q. L., Wei W., Jiang L. and Shen J. L. 2013b. Toxoplasma gondii prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity. Parasites & vectors 6: 273-3305-6-273.

Wang L., Cheng H. W., Huang K. Q., Xu Y. H., Li Y. N., Du J., Yu L., Luo Q. L., Wei W., Jiang L. and Shen J. L. 2013c. Toxoplasma gondii prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity. Parasites & vectors 6: 273-3305-6-273.

Wang Y. and Yin H. 2015. Research advances in microneme protein 3 of Toxoplasma gondii. Parasites & vectors 8: 384-015-1001-4.

Wang Y. and Yin H. 2014. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of Toxoplasma gondii. Parasites & vectors 7: 180-3305-7-180.

Watanabe M., Ueno Y., Yajima T., Iwao Y., Tsuchiya M., Ishikawa H., Aiso S., Hibi T. and Ishii H. 1995. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. The Journal of clinical investigation 95: 2945-2953.

Wiengcharoen J., Nakthong C., Mitchaothai J., Udonsom R. and Sukthana Y. 2012. Toxoplasmosis and neosporosis among beef cattle slaughtered for food in Western Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 43: 1087-1093.

Wilson D. E. and Reeder D. M. 2005. Mammal Species of the World, Johns Hopkins University Press; ed. American Society of Mammalogists.

Wolf A., Cowen D. and Paige B. 1939. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as en encephalomyelitis. Verification by transmission to animals. Science 89: 226-227.

Work T. M., Dagenais J., Rameyer R. and Breeden R. 2015. Mortality Patterns in Endangered Hawaiian Geese (Nene; Branta Sandvicensis). Journal of wildlife diseases 51: 688-695.

Wu S. M., Ciren D., Huang S. Y., Xu M. J., Ga G., Yan C., Mahmoud M. S., Zou F. C. and Zhu X. Q. 2012. First report of Toxoplasma gondii prevalence in Tibetan pigs in Tibet, China. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 12: 654-656.

Xia D., Sanderson S. J., Jones A. R., Prieto J. H., Yates J. R., Bromley E., Tomley F. M., Lal K., Sinden R. E., Brunk B. P., Roos D. S. and Wastling J. M. 2008. The proteome of Toxoplasma gondii: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. Genome biology 9: R116-2008-9-7-r116. Epub 2008 Jul 21.

Xu P., Li X., Guo L., Li B., Wang J., Yu D., Zhao Q. and Liu X. G. 2014a. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in Liaoning cashmere goat from northeastern China. Parasite (Paris, France) 21: 22.

Xu Y., Li R. C., Liu G. H., Cong W., Zhang X. X., Yu X. L. and Zhu X. Q. 2014b. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in sows in Hunan province, China. TheScientificWorldJournal 2014: 347908.

Xu Y., Wang X., Liu J., Fu Y., Xu J., Liu Q. 2018. Toxoplasma gondii rhoptry protein38 (TgROP38) affects parasite invasion, egress, and induces IL-18 secretion during early infection. Acta Biochimca et Biophysica Sinica (Shanghai) 50: 766-775.

Yaglom H. D., Rottinghaus A. A. and Pithua P. 2014. Evidence of Toxoplasma gondii exposure in Boer goat herds in Missouri, USA. Zoonoses and public health 61: 395-397.

Yamamoto M., Ma J. S., Mueller C., Kamiyama N., Saiga H., Kubo E., Kimura T., Okamoto T., Okuyama M., Kayama H., Nagamune K., Takashima S., Matsuura Y., Soldati-Favre D. and Takeda K. 2011. ATF6beta is a host cellular target of the Toxoplasma gondii virulence factor ROP18. The Journal of experimental medicine 208: 1533-1546.

Yamamoto M., Standley D. M., Takashima S., Saiga H., Okuyama M., Kayama H., Kubo E., Ito H., Takaura M., Matsuda T., Soldati-Favre D. and Takeda K. 2009. A single polymorphic amino acid on Toxoplasma gondii kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. The Journal of experimental medicine 206: 2747-2760.

Yang N., Mu M. Y., Li H. K., Long M. and He J. B. 2012. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in slaughtered chickens, ducks, and geese in Shenyang, northeastern China. Parasites & vectors 5: 237-3305-5-237.

Yarovinsky F. 2014. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection. Nature reviews.Immunology 14: 109-121.

Zhang M., Yang Z., Wang S., Tao L., Xu L., Yan R., Song X. and Li X. 2014. Detection of Toxoplasma gondii in shellfish and fish in parts of China. Veterinary parasitology 200: 85-89.

Zhang W., Li L., Xia N., Zhou Y., Fang R., He L., Hu M., Shen B. and Zhao J. 2016. Analysis of the virulence determination mechanisms in a local Toxoplasma strain (T.gHB1) isolated from central China. Parasitology research 115: 3807-3815.

Zheng L., Hu Y., Hua Q., Luo F., Xie G., Li X., Lin J., Wan Y., Ren S., Pan C., Tan F. 2017. Protective immune response in mice induced by a suicidal DNA vaccine encoding NTPase-II gene of Toxoplasma gondii. Acta Trop 166: 336-342.

Zhou D. H., Zhao F. R., Lu P., Xia H. Y., Xu M. J., Yuan L. G., Yan C., Huang S. Y., Li S. J. and Zhu X. Q. 2012. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in dairy cattle in southern China. Parasites & vectors 5: 48-3305-5-48.