



Détection sérologique de l'infection latente par *Toxoplasma gondii* par des biomarqueurs spécifiques des kystes et des bradyzoïtes

Marie Gladys Robert

► To cite this version:

Marie Gladys Robert. Détection sérologique de l'infection latente par *Toxoplasma gondii* par des biomarqueurs spécifiques des kystes et des bradyzoïtes. Microbiologie et Parasitologie. Université Grenoble Alpes [2020-...], 2022. Français. ⟨NNT : 2022GRALV074⟩. ⟨tel-04416406⟩

HAL Id: tel-04416406

<https://theses.hal.science/tel-04416406v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Unité de recherche : IAB : Epigenetics, Environment, Cell Plasticity, Cancer (UGA / Inserm U1209 / CNRS UMR 5309)

Détection sérologique de l'infection latente par *Toxoplasma gondii* par des biomarqueurs spécifiques des kystes et des bradyzoïtes

Serological detection of latent *Toxoplasma gondii* infection by cyst and bradyzoite specific biomarkers

Présentée par :

Marie Gladys ROBERT

Direction de thèse :

Mohamed-Ali HAKIMI

INSERM

Directeur de thèse

Hervé PELLOUX

CHU Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

Martine WALLON

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Claude Bernard - Lyon 1

Nicolas BLANCHARD

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation Occitanie Pyrénées

Thèse soutenue à huis clos le **18 novembre 2022**, devant le jury composé de :

Martine WALLON

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Claude Bernard - Lyon 1

Rapporteuse

Nicolas BLANCHARD

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation Occitanie Pyrénées

Rapporteur

Fabrice LAURENT

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INRAE centre Val de Loire

Examineur

Pascal POIGNARD

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Grenoble Alpes

Président

Mohamed-Ali HAKIMI

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes

Directeur de thèse

Hervé PELLOUX

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Invités :

Marie-Pierre BRENIER-PINCHART

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Grenoble Alpes



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs de thèse, les Dr. Mohamed-Ali Hakimi et Pr. Hervé Pelloux, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé au sein de l'équipe de recherche et de l'équipe hospitalière, pour m'avoir confié ce travail et pour l'accompagnement et la confiance qu'ils m'ont accordé tout au long de mon parcours.

J'adresse également mes remerciements au Dr. Marie-Pierre Brenier-Pinchart qui a co-encadré ce travail et avec qui j'ai eu plaisir à travailler au cours de ces quatre années. Je suis ravie que notre collaboration se poursuive au-delà.

Je remercie sincèrement Mme la Pr. Martine Wallon et M. le Dr. Nicolas Blanchard pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie également M. le Dr. Fabrice Laurent et M. le Pr. Pascal Poignard d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie les membres de l'équipe Interactions hôte-pathogène et immunité des infections au sein de laquelle j'ai effectué ce travail. Je remercie tout particulièrement Christopher Swale, moteur de ce projet et tuteur pédagogue et passionné, ainsi que Valeria Bellini, mon binôme de sérologie bradyzoïte. Merci également à Laurence Braun, Dominique Cannella, Charlotte Corrao et Alexandre Bougdour pour leur soutien et pour leur aide au cours de ce projet. Merci à Ana, Bellen, Sylvia et Martina pour tous ces instants de vie partagés.

Merci à Céline Dard et Dayana Farhat qui m'ont précédées en tant qu'étudiantes en thèse dans l'équipe, et dont les brillants travaux ont ouvert la voie à ce projet.

Merci aussi à Isabelle Tardieux et à toute son équipe pour nos échanges sur ce projet et sur bien d'autres sujets.

Je remercie l'ensemble de l'équipe du service de Parasitologie et Mycologie du CHU Grenoble Alpes, et tout particulièrement mes collègues biologistes, ceux cités ci-dessus mais aussi Iyad Almahmoud, Odile Cognet, Muriel Cornet, Hélène Fricker-Hidalgo, Cécile Garnaud et Danièle Maubon qui m'ont permis de sanctuariser

du temps pour ce travail de thèse au cours de mon assistantat hospitalo-universitaire, et qui m'ont tant appris depuis mon arrivée au laboratoire.

J'aimerais également remercier Catherine Ramina pour sa relecture attentive.

À ma famille et à mes proches enfin, merci d'être à mes côtés.

À Clément,
À Ambroise,

TABLE DES MATIERES

RESUME	8
SUMMARY.....	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	13
PREAMBULE	15
CHAPITRE I : INTRODUCTION	17
I. TOXOPLASMA GONDII	18
1. ENTREE EN MATIERE	18
1. Taxonomie.....	18
2. Apicomplexes, santé publique et économie	19
3. Cycle parasitaire	23
2. TOXOPLASMA GONDII COMME MODELE EXPERIMENTAL.....	28
1. Des caractéristiques communes aux apicomplexes.....	28
2. Modèle expérimental	31
3. STRUCTURE DES POPULATIONS PARASITAIRES	33
1. Méthodes d'étude	33
2. État des connaissances.....	34
3. Variations géographiques : éléments d'explications.....	35
4. INTERACTIONS ENTRE <i>T. GONDII</i> ET SON HOTE	36
1. Dissémination chez l'hôte.....	36
2. Réponse immune	38
3. Défenses parasitaires	42
II. KYSTE ET DIFFERENCIATION EN BRADYZOÏTE	43
1. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA DIFFERENCIATION	44
1. Sur les traces des APETALA.....	45
2. BFD1, coupable idéal.....	46
3. MORC, HDAC3 et la piste épigénétique.....	47
2. PAROI KYSTIQUE	51
3. SPECIFICITE DES KYSTES ET DES BRADYZOÏTES.....	54
1. Caractéristiques morphologiques et localisation	54
2. Physiologie	56
3. Profil protéique et marqueurs de bradyzoïtes.....	58

III. TOXOPLASMOSE HUMAINE	60
1. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	60
1. <i>Séroprévalence</i>	60
2. <i>Modes de contamination</i>	61
2. PRESENTATIONS CLINIQUES	63
1. <i>Toxoplasmose acquise de l'immunocompétent</i>	63
2. <i>Toxoplasmose congénitale</i>	64
3. <i>Toxoplasmose de l'immunodéprimé</i>	70
4. <i>Conséquences suspectées</i>	72
3. APERÇU DES OPTIONS THERAPEUTIQUES ET PROPHYLACTIQUES	74
IV. DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE.....	76
1. BIOLOGIE MOLECULAIRE : ARTICLE 1	78
2. SEROLOGIE	94
1. <i>Cinétique des anticorps</i>	94
2. <i>Techniques</i>	95
3. <i>Antigènes</i>	98
CHAPITRE II : DETECTION SEROLOGIQUE D'ANTIGENES DU STADE CHRONIQUE DE TOXOPLASMA GONDII :	
IDENTIFICATION D'UN MARQUEUR SEROLOGIQUE DU BRADYZOÏTE.....	118
1. INTRODUCTION	119
2. ARTICLE 2.....	121
DISCUSSION GENERALE.....	174
1. DEPLETER MORC POUR REVELER DES ANTIGENES BRADYZOÏTES	174
2. BSM, DnAK-TPR DE FONCTION INCONNUE.....	174
3. BSM, ANTIGENE INTRACYTOPLASMIQUE IMMUNOGENE.....	176
4. INTERET D'UN MARQUEUR DE PORTAGE DE KYTE CHEZ L'ANIMAL	176
5. DIFFICULTÉS D'INTERPRETATION DE LA SEROLOGIE BRADYZOÏTE CHEZ L'HUMAIN	177
6. PERSPECTIVES.....	180
1. <i>Axes d'amélioration</i>	180
2. <i>Conséquences suspectées de l'infection chronique : un nouvel angle d'évaluation</i>	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	182

RESUME

La toxoplasmose est une zoonose cosmopolite généralement bénigne chez les sujets immunocompétents, mais responsable d'infections congénitales et opportunistes potentiellement sévères. Cette infection entraîne la persistance chronique du parasite *Toxoplasma gondii* sous forme de bradyzoïtes enkystés, notamment dans le système nerveux central, les muscles et la rétine de ses nombreux hôtes intermédiaires potentiels. Cette persistance est un facteur majeur de la transmission de l'infection par le carnivorisme et est la source de réactivation en cas d'immunosuppression. Cependant, le stade chronique de *T. gondii* reste relativement méconnu, en raison notamment de l'absence de méthodes adaptées à son évaluation. Alors même que la sérologie est un élément clé des études épidémiologiques et du diagnostic de cette parasitose, et bien que la contribution du bradyzoïte à la physiopathologie de l'infection soit indéniable, aucun des tests sérologiques actuellement utilisés n'est basé sur des antigènes spécifiques du bradyzoïte. L'identification de la protéine de la paroi kystique BCLA (*Brain Cyst Load-associated Antigen*) a récemment prouvé que les antigènes de ce stade parasitaire ne sont cependant pas dépourvus d'immunogénicité.

L'objectif de ce travail était de rechercher d'autres marqueurs sérologiques du stade chronique de *T. gondii* et d'évaluer la performance de la sérologie s'appuyant sur des antigènes du bradyzoïte pour détecter la présence de kystes, et son apport potentiel au diagnostic et à la prise en charge de la toxoplasmose chez l'humain.

La comparaison de l'immunogénicité des protéines bradyzoïtes induites *in vitro* à l'aide du système MORC-mAID par rapport aux antigènes tachyzoïtes a permis de mettre en évidence l'immunogénicité d'une protéine abondante du cytoplasme du bradyzoïte que nous avons nommé BSM (*Bradyzoite Serological Marker*). La délétion de BSM via CRISPR/Cas9 n'impacte pas la croissance *in vitro*, la virulence, la différenciation ou la morphologie des kystes *in vivo*. La sérologie ELISA BSM a identifié parmi des souris naïves ou chroniquement infectées par des souches kystogéniques ou non kystogéniques de *T. gondii*, celles qui portaient des kystes, avec une sensibilité de 97,96% et une spécificité de 100%. Chez l'humain, les titres d'anticorps anti-BSM et anti-BCLA sont significativement plus élevés chez les sujets identifiés comme chroniquement infectés par *T. gondii* par les tests sérologiques classiques, que chez les patients séronégatifs. Cependant la distribution large des titres au sein des deux groupes et l'absence de marqueur du portage de kystes complexifie l'interprétation de la sérologie bradyzoïte, et questionne sur la présence systématique de kystes à la suite d'une infection et la durée de la persistance de ces derniers.

En conclusion, cette étude a permis d'identifier un nouveau marqueur sérologique du stade chronique de *T. gondii*. Si des applications en agroalimentaire ou en expérimentation animale peuvent être envisagées, des explorations complémentaires sont requises pour comprendre la cinétique de la sérologie bradyzoïte chez l'humain.

Mots clés

Toxoplasmose ; *Toxoplasma gondii* ; bradyzoïte ; infection chronique ; marqueur sérologique ; antigène recombinant.

SUMMARY

Toxoplasmosis is a widespread zoonosis generally benign in immunocompetent individuals but responsible for potentially severe congenital and opportunistic infections. This infection leads to the chronic persistence of the parasite *Toxoplasma gondii* in the form of encysted bradyzoites, notably in the central nervous system, muscles and retina of its numerous potential intermediate hosts. This persistence is a major factor in the transmission of infection through carnivorous animals and is the source of reactivation in cases of immunosuppression. However, the chronic stage of *T. gondii* remains relatively unknown, due in part to the lack of non-invasive methods for its assessment. Although serology is a key element in epidemiological studies and diagnosis of this parasitosis, and despite the undeniable contribution of the bradyzoite to the pathophysiology of the infection, none of the currently used serological tests is based on specific bradyzoite antigens. The identification of the cystic wall protein BCLA (Brain Cyst Load-associated Antigen) has recently demonstrated that the antigens of this parasitic stage are however not devoid of immunogenicity.

The aim of this work was to search for other serological markers of the chronic stage of *T. gondii* and to evaluate the performance of serology based on bradyzoite antigens to detect the presence of cysts, and its potential contribution to the diagnosis and management of toxoplasmosis in humans.

Comparison of the immunogenicity of bradyzoite proteins induced *in vitro* using the MORC-mAID system versus tachyzoite antigens revealed the immunogenicity of an abundant bradyzoite cytoplasmic protein that we named BSM (Bradyzoite Serological Marker). Deletion of BSM via CRISPR/Cas9 does not affect *in vitro* growth, virulence, differentiation, or cyst morphology *in vivo*. BSM ELISA serology identified among naïve or chronically infected mice with cystogenic or non-cystogenic strains of *T. gondii*, those carrying cysts, with a sensitivity of 97.96% and a specificity of 100%. In humans, anti-BSM and anti-BCLA antibody titers are significantly higher in subjects identified by conventional serological tests as chronically infected with *T. gondii* than in seronegative patients, but the wide distribution of titers within both groups and the lack of a marker of cyst carriage challenge the interpretation of bradyzoite serology and raise questions about the systematic presence of cysts following infection and the duration of their persistence.

In conclusion, this study has identified a new serological marker of the chronic stage of *T. gondii*. If an application in agri-food or animal experimentation can be envisaged, further explorations are required to understand the kinetics of bradyzoite serology in humans.

Key words

Toxoplasmosis; *Toxoplasma gondii*; bradyzoite; chronic infection; serological marker; recombinant antigen.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Arbre phylogénétique schématique représentant les relations taxonomiques entre les principales espèces d'intérêt médical et/ou vétérinaire appartenant au phylum Apicomplexa.....	23
Figure 2. Cycle parasitaire de <i>T. gondii</i>	25
Figure 3. Morphologie et structure des différents stades parasites de <i>T. gondii</i>	27
Figure 4. Complexe apical de <i>T. gondii</i>	28
Figure 5. Processus d'invasion de la cellule hôte par <i>T. gondii</i>	30
Figure 6. Structure génétique des populations de <i>T. gondii</i>	35
Figure 7. Atteinte du système nerveux central par <i>T. gondii</i>	38
Figure 8. Reconnaissance immunitaire de <i>T. gondii</i> en fonction de l'hôte.	40
Figure 9. Représentation schématique du processus d'activation des LB et de production des anticorps.....	42
Figure 10. Vue d'ensemble de la kystogénèse.	44
Figure 11. Modifications post-traductionnelles des histones.	50
Figure 12. Knockdown inductible de la protéine MORC à l'aide du système mAID.	51
Figure 13. BCLA, protéine immunogène de la paroi kystique.	54
Figure 14. Modèle 3D d'une coupe de kyste cérébral en modèle murin obtenu à partir d'images de microscopie électronique.	55
Figure 15. Principaux marqueurs des stades bradyzoïtes et tachyzoïtes et leur localisation.....	60
Figure 16. Distribution mondiale de la séroprévalence de l'infection par <i>T. gondii</i>	61
Figure 17. Risques pour le fœtus en cas de séroconversion au cours de la grossesse. Données françaises.....	65
Figure 18. Évolution du risque d'infection congénitale et du risque de manifestations cliniques chez le fœtus en fonction de l'âge gestationnel au moment de la séroconversion.	66
Figure 19. Logigramme de surveillance sérologique de la toxoplasmose chez la femme enceinte.....	69

Figure 20. Stratégies de prise en charge d'une séroconversion maternelle en fonction de l'âge gestationnel.....	70
Figure 21. Cinétique des anticorps anti-Toxoplasma gondii après une primo-infection.	95
Figure 22. Arbre phylogénétique des homologues de TGME49_202020 parmi les Apicomplexes.	180

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. ApiAP2 impliquées dans la différenciation chez <i>T. gondii</i>	46
Tableau 2. Molécules et associations disponibles en traitement ou prophylaxie de la toxoplasmose.	75
Tableau 3. Modalités diagnostiques en fonction du contexte clinique et immunitaire.	77
Tableau 4. Antigènes recombinants de <i>T. gondii</i> évalués comme marqueurs sérologiques dans la toxoplasmose.	102

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AP2 : Domaine Apetala

ApiAP2 : Protéine chez les apicomplexes comportant un domaine AP2

ARN : Acide ribonucléique

BCLA : *Brain Cyst Load-associated Antigen*

BSM : *Bradyzoite Serological Marker*

BFD1 : Bradyzoite Formation Deficient 1

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CLIA : *Chemiluminescent immunoassay*

CNR : Centre National de Référence

CPDPN : Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CUT & RUN : *Cleavage Under Target & Release Using Nuclease*

DALY : Années de vie Corrigée du facteur d'Invalidité (*Disability-Adjusted Life Year*)

DBA : *Dolichos biflorus agglutinin*

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHPS : Dihydroptéroate synthase

EIA : *Enzyme Immunoassay*

ELFA : *Enzyme-linked fluorescent assay*

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ENO : Enolase

GCSH : Greffe de cellules souches hématopoïétiques

GRA : Protéine issue des granules denses

HAT : Histones acétyltransférases

HDAC : Histones désacétylases

HXGPRT : Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransférase

IAA : Acide indol-3-acétique

IFN- γ : Interféron- γ
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IMG : Interruption médicale de grossesse
ISAgA : Immuno Sorbent Agglutination Assay
JM : Jonction mobile
KAT : lysine acétyltransférases
LBA : Lavage broncho-alvéolaire
LCS : Liquide cérébro-spinal
LDH : Lactate deshydrogénase
MFIU : Mort fœtale *in utero*
NHEJ : Non-homologous end joining
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
P-S : Pyriméthamine-Sulfonamide (sulfadiazine ou sulfadoxine)
PTM : Modifications post-traductionnelles des histones
QALY : de l'anglais quality-adjusted life year
ROP : Protéine issue des rhoptries
SA : Semaine d'aménorrhée
SNC : Système nerveux central
SRS : SAG1 related sequence
TC : Toxoplasmose congénitale
TLR : Toll-like receptor
TOS : Transplantation d'organe solide
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

PREAMBULE

En 1908, les deux médecins français Charles Nicolle et Louis Manceaux étudient la leishmaniose dans leur laboratoire à l'Institut Pasteur de Tunis, et travaillent sur de petits rongeurs d'Afrique du Nord nommés *Ctenodactylus gundi*. Lorsqu'ils isolent chez l'un de ces rongeurs un organisme unicellulaire en forme de croissant, ils pensent d'abord avoir affaire à un parasite du genre *Leishmania*. Cette méprise sera commise une seconde fois cette année-là, lorsqu'au Brésil, l'italien Alfonso Splendore retrouve un parasite similaire chez un lapin. Nicolle et Manceaux vont cependant rapidement se rendre à l'évidence : ils viennent d'identifier un nouvel organisme. En 1909, celui-ci sera officiellement nommé *Toxoplasma gondii* (du grec ancien *toxos* = arc, et *plasma* = forme) en référence à sa forme arquée et au rongeur chez lequel il a été retrouvé un an plus tôt (Nicolle & Manceaux, 1909). Par la suite, ce parasite sera identifié chez de nombreux hôtes, dont l'humain. Chez ce dernier, il sera d'abord décrit comme agent étiologique d'infections oculaires en 1923, puis également congénitales dès 1939, et disséminées en 1940 (Innes, 2010; Pinkerton & Weinman, 1940; Wolf et al., 1939).

C'est incontestablement le dye test, premier test diagnostique sérologique de la toxoplasmose mis au point par Albert Sabin et Harry Feldman en 1948, qui a permis le déploiement d'études épidémiologiques humaines et animales à grande échelle, et ainsi la découverte du large éventail des hôtes intermédiaires et de l'ampleur de la distribution de l'infection parmi ces derniers (Sabin & Feldman, 1948).

Depuis, la sérologie a conservé au fil des décennies une place primordiale dans le diagnostic, et ce quelle que soit la présentation clinique. Les tests ont pu évoluer depuis ces débuts, au milieu du siècle dernier. Le dye test a désormais le plus souvent cédé sa place à des techniques immunoenzymatiques plus simples à maîtriser, mais le tachyzoïte entier reste le plus souvent la source antigénique privilégiée. Et lorsque des antigènes recombinants sont utilisés, il s'agit d'antigènes exprimés uniquement par ce même tachyzoïte. Pourtant, si le tachyzoïte est à l'origine des symptômes de l'infection aiguë, il se convertit rapidement en bradyzoïte, et forme des kystes réputés persistants pendant toute la vie de l'hôte.

Alors se pourrait-il que l'on se prive d'une partie du message ?

On a longtemps pensé le bradyzoïte et le kyste comme des entités inertes, tant du point de vue physiopathologique que du point de vue de l'immunogénicité. Plusieurs publications sont pourtant venues bouleverser cette représentation (Dzierszinski et al., 2004; Nance et al., 2012; Watts et al., 2015).

Aussi, la mise en évidence en 2021 par notre équipe de recherche de BCLA, premier marqueur sérologique du bradyzoïte et du kyste, a constitué une preuve de concept qu'une sérologie ciblée sur le kyste était envisageable. Dès lors, la nécessité de rechercher d'autres antigènes bradyzoïtes immunogènes est apparue évidente. En effet, si ces caractéristiques n'étaient pas uniquement propres à BCLA, les résultats prometteurs mais encore confus, obtenus avec cet antigène pourraient être confrontés à un référentiel plus comparable qu'une sérologie basée sur le stade tachyzoïte, et l'interprétation pourrait ainsi être plus aisée. L'idée d'une sérologie « bradyzoïte » s'appuyant sur plusieurs marqueurs naissait également.

C'est dans ce contexte et avec cet objectif qu'en 2018, tout juste 110 ans après la découverte de *Toxoplasma gondii*, j'ai entamé mon travail de doctorat d'université.

Ce fut pour moi l'occasion de m'initier à de nombreuses techniques innovantes, et de développer mon esprit critique, en utilisant comme prétexte *Toxoplasma*, ce modèle pour l'étude de nombreux parasites Apicomplexes si importants en santé humaine et animale.

Après 4 années jalonnées d'expériences réussies, et d'autres un peu moins, je livre ici les résultats des travaux qui sont les miens, mais aussi ceux de toute l'équipe *Interactions Hôte-Pathogène & Immunité des infections* qui m'a accompagnée, soutenue, portée.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. *TOXOPLASMA GONDII*

1. ENTREE EN MATIERE

1. TAXONOMIE

La classification des êtres vivants évolue au fil des courants de pensées et des avancées technologiques. La systématique phylogénétique, qui classe les organismes en fonction de leur degré de parenté selon des critères morphologiques, biochimiques et moléculaires, prévaut aujourd'hui sur la classification linnéenne. Si la classification taxonomique des animaux, plantes, champignons et bactéries est relativement stable et universellement adoptée, il n'en est pas de même pour celle des eucaryotes unicellulaires, bien que des initiatives en ce sens existent (Berney et al., 2017). C'est dans ce contexte que l'International Society of Protistologists a proposé dès 2005 une classification basée sur un système de grades hiérarchiques sans dénomination et faisant abstraction des terminaisons des noms de clades (Adl et al., 2005). Ainsi les clades conservent-ils leur nom lorsque leur grade ou leur composition sont amenées à être modifiés, ce qui permet une certaine stabilité de la classification. Les révisions apportées à cette classification en 2012 et en 2019 n'ont consisté qu'en des mises à jours pour tenir compte des dernières avancées (Adl et al., 2012, 2019). Selon la dernière version, *Toxoplasma gondii*, seule espèce du genre *Toxoplasma*, est classée de la façon suivante :

Eukaryota

> **Alveolata** : Présence de vésicules sous-membranaires.

> **Apicomplexa** : Au moins un stade du cycle de vie avec un complexe apical ; sexualité par syngamie suivie d'une méiose immédiate pour produire une descendance haploïde ; reproduction asexuée de stades haploïdes se produisant par fission binaire, endodyogénie, endopolygénie et/ou schizogonie/mérogonie ; locomotion par glissement, flexion du corps, crêtes longitudinales et/ou cils.

> **Conoidasida** : Complexe apical complet ; à l'exception des microgamètes, la motilité se fait généralement par glissement avec possibilité de flexion du corps et d'ondulation des crêtes pelliculaires longitudinales ; hétéroxène ou homoxène.

> **Coccidia** : Formation intracellulaire des gamètes matures ; le zygote est rarement mobile ; les sporocystes se forment généralement à l'intérieur des oocystes.

> **Eimeriorina** : Les microgamètes et les macrogamètes se développent indépendamment ; les microgamontes produisent un grand nombre de microgamètes ciliés.

> **Toxoplasma**

> ***Toxoplasma gondii***

Pour comparaison, la classification systématique en cours (Taxonomy NCBI, mai 2022) positionne *Toxoplasma gondii* comme suit :

Règne : Eucaryotes ;

Phylum : Apicomplexa ;

Classe : Conoidasida ;

Ordre : Eucoccidiorida ;

Famille : Sarcocystidae ;

Genre : *Toxoplasma* ;

Espèce : *Toxoplasma gondii*

2. APICOMPLEXES, SANTE PUBLIQUE ET ECONOMIE

Au sein du phylum Apicomplexa qui compte plusieurs milliers d'organismes unicellulaires différents, figurent de nombreuses espèces d'importance médicale et/ou vétérinaire (

Figure 1). Il y a donc à la fois un intérêt de santé publique mais également un intérêt économique, à améliorer la compréhension de la biologie de ces organismes afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, d'améliorer le diagnostic des pathologies associées ou encore de développer des moyens de prévention.

Les paragraphes suivants s'intéressent succinctement aux principaux apicomplexes impliqués en pathologie humaine et/ou animale.

a) Genres et espèces d'intérêt médical

Le paludisme, problème de santé publique majeur qui compte parmi les premières causes de mortalité dans les pays à faible revenu, est causé par un apicomplexe du

genre *Plasmodium*. Plusieurs espèces infectent l'humain, mais la quasi-totalité des formes sévères est due à *Plasmodium falciparum*. Malgré des progrès considérables depuis quelques décennies du fait d'efforts consentis à l'échelle internationale, l'OMS fait encore état de 241 millions de cas et de 627 000 décès en 2020, essentiellement chez des enfants de moins de 5 ans (World Health Organization, 2021).

Cystoisospora belli est un parasite spécifiquement humain acquis principalement dans les régions tropicales et responsable d'infections intestinales qui peuvent être sévères et récurrentes chez les patients immunodéprimés (Dubey & Almeria, 2019).

La cyclospore, infection digestive causée par *Cyclospora cayetanensis*, peut affecter immunocompétents et immunodéprimés, mais l'atteinte est plus sévère en cas d'immunodépression (Almeria et al., 2019). La contamination est de loin plus fréquente en région tropicale, mais de petites épidémies causées par des produits frais généralement importés ont pu être rapportées hors zone d'endémie (Hadjilouka & Tsaltas, 2020).

b) Genres et espèces d'intérêt vétérinaire

Neospora caninum a le chien pour hôte définitif, et différents mammifères - notamment d'élevage (moutons, chèvres, chevaux...) - peuvent être hôtes intermédiaires et porteurs de kystes (Dubey, 2003). Si l'infection est fréquente et potentiellement symptomatique chez le chien, la neosporose est surtout considérée comme l'une des plus importantes causes infectieuses d'avortement chez les bovins. L'impact économique a été évalué à plus de 2 milliards de dollars par an (Reichel et al., 2013).

Le genre *Theileria* regroupe plusieurs espèces transmises par des tiques à un large éventail d'animaux domestiques et sauvages, causant chez ces derniers des symptômes plus ou moins sévères en fonction des espèces (Mans et al., 2015). Parmi elles on peut citer, *Theileria parva*, responsable de la fièvre de la côte orientale, *T. annulata*, responsable de la theilerioses tropicale, qui entraînent une morbidité et une mortalité importante du bétail notamment en Afrique subsaharienne, avec des conséquences socio-économiques non négligeables (Bishop et al., 2020). Les pertes économiques liées à la fièvre de la côte orientale avaient pu être estimées à 168 millions de dollars en 1989 (Mukhebi et al., 1992).

Plusieurs espèces du genre *Eimeria* sont capables d'induire des infections intestinales potentiellement mortelles chez les animaux d'élevage comme les ruminants ou les volailles (Daugochies & Najdrowski, 2005).

Cystoisospora suis est responsable d'une infection intestinale symptomatique chez les jeunes porcelets. Si la mortalité associée est relativement faible, des pertes économiques peuvent être liées à la moindre prise de poids des animaux infectés (Worliczek et al., 2007).

Besnoitia besnoiti entraîne une infection aiguë puis chronique chez les bovins. Les deux stades de la maladie entraînent une altération de l'état général pouvant conduire à la mort des animaux infectés. Les pertes économiques sont également liées à la diminution de productivité et de fertilité des animaux survivants (Cortes et al., 2014).

c) Espèces zoonotiques

T. gondii peut infecter l'ensemble des animaux à sang chaud, avec des conséquences variables en fonction des espèces. Les dommages peuvent être sévères chez les petits ruminants (moutons, chèvres) pour qui la toxoplasmose représente en effet une cause importante d'infections congénitales et d'avortements (Stelzer et al., 2019). Une étude de 1999 estimait les pertes pour la filière entre 1,4 et 4,7 millions de dollars en Uruguay (Freyre et al., 1999). En Grande Bretagne, les pertes pour l'élevage de moutons sont estimées entre 6,4 et 19,8 millions de Livres sterling (Bennett & Ijpelaar, 2005). Il est également à noter qu'en Asie, des épisodes cliniques liés à *T. gondii* sont fréquemment rapportés dans la filière porcine, avec des pertes économiques associées (Pan et al., 2017). Si chez les bovins, les chevaux et les volailles, l'infection est asymptomatique ou passe le plus souvent inaperçue, ces animaux d'élevage n'en demeurent pas moins des sources de contamination potentielles pour l'humain (Kijlstra & Jongert, 2009).

À l'image de *T. gondii*, plusieurs Apicomplexa se transmettent de l'animal à l'humain, et répondent ainsi à la définition de zoonose.

Les espèces du genre *Cryptosporidium* entraînent des infections entériques chez leurs hôtes. Chez l'humain, la cryptosporidiose est avec la toxoplasmose, l'une des principale parasitose d'origine alimentaire selon l'OMS (Boireau et al., 2014). C'est également la deuxième cause de décès par diarrhée chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays à faible revenus (GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017). Plusieurs espèces peuvent infecter l'humain, mais *C. parvum* et *C. hominis* sont responsables de la grande majorité des cas. Si la transmission de *C. hominis* est considérée comme anthroponotique – bien qu'il ait pu être isolé également chez l'animal –, l'infection par *C. parvum* est d'origine zoonotique et plusieurs épisodes épidémiques ont été associés à une transmission directe ou indirecte de l'animal à

l'humain. L'expression clinique chez l'animal, et notamment chez les animaux de ferme, peut entraîner des pertes économiques notables (Robertson et al., 2014).

Les hématozoaires du genre *Babesia* sont transmis par les tiques *Ixodes*. Seules quelques-unes des espèces de *Babesia* qui infectent les animaux sauvages et domestiques sont impliqués en pathologie humaine. Les cas de babésiose humaine sont principalement décrits dans le Nord-Est des Etats-Unis, mais des cas sporadiques sont également rapportés ailleurs dans le monde et notamment en Europe. L'infection peut être asymptomatique ou accompagnée de symptômes aspécifiques à type de fièvre, céphalée, asthénie et myalgie. Des formes sévères voire mortelles sont également décrites, notamment chez les sujets immunodéprimés (Krause, 2019).

Sarcocystis hominis et *S. suihominis* sont responsables d'infections digestives habituellement modérées acquises respectivement par ingestion de viande de bœuf ou de porc mal cuite et contenant des kystes du parasite. De rares infections musculaires, au cours desquelles l'humain est hôte intermédiaire accidentel d'autres espèces du genre, ont été décrites principalement en Asie du Sud-Est (Fayer et al., 2015).

Le concept « One Health » (une seule santé) qui reconnaît et intègre les liens entre environnement, santé humaine et vétérinaire, est une approche particulièrement adaptée aux zoonoses. Le développement de stratégies optimales de prévention et de contrôle de ces maladies infectieuses que l'humain partage avec l'animal et acquière via l'alimentation ou l'environnement, nécessite en effet des collaborations transdisciplinaires (Zinsstag et al., 2011).

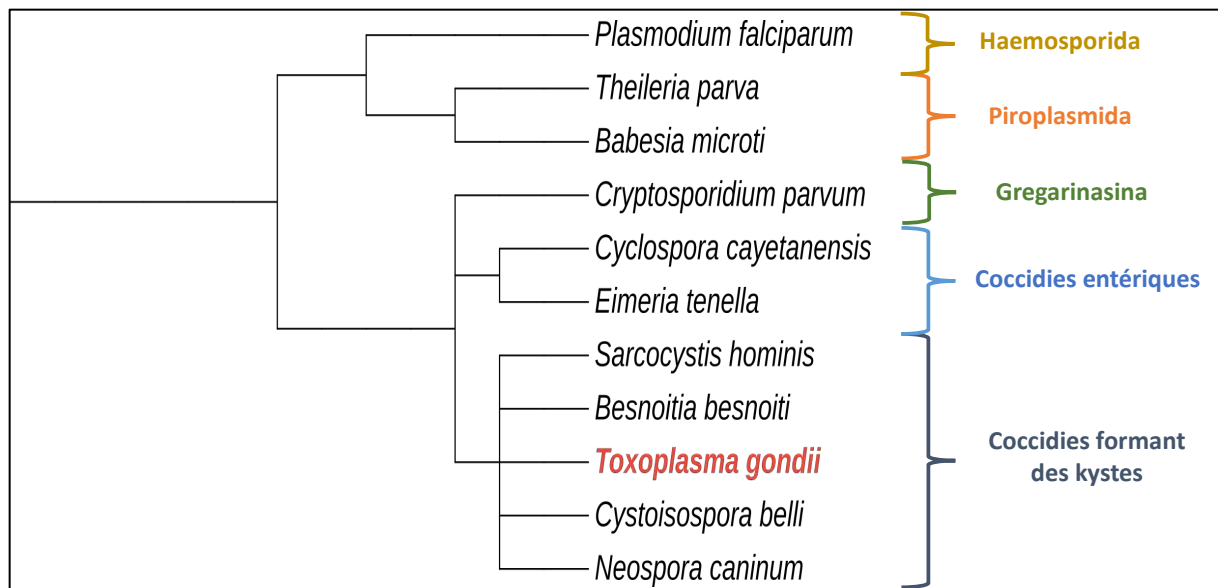


Figure 1. Arbre phylogénétique schématique représentant les relations taxonomiques entre les principales espèces d'intérêt médical et/ou vétérinaire appartenant au phylum Apicomplexa.

Réalisé à l'aide de PhyloT v2 (<https://phylot.biobyte.de/>) d'après les données de NCBI Taxonomy.

3. CYCLE PARASITAIRE

a) Cycle hétéroxène

T. gondii est un parasite hétéroxène au cycle complexe entre un hôte définitif et de nombreux hôtes intermédiaires potentiels (Figure 2).

La reproduction sexuée de *T. gondii* se produit uniquement dans les cellules intestinales des félins, qu'ils soient sauvages ou domestiques. Cette restriction aux félins serait due à l'excès d'acide linoléique chez ces mammifères qui sont les seuls à être dépourvus de l'enzyme indispensable au métabolisme de cet acide gras, la delta-6-desaturase, au niveau intestinal (Genova et al., 2019). La reproduction sexuée de *T. gondii* est un processus extrêmement efficace puisque l'infection par ingestion d'un seul bradyzoïte peut entraîner la libération de millions d'oocystes dans l'environnement (Dubey, 2001).

La contamination des félins par ingestion d'oocystes est possible, bien que moins productive que le carnivorisme, soit l'ingestion de kystes (Jones & Dubey, 2010). Les bradyzoïtes que contiennent ces derniers sont libérés après la lyse de la paroi du kyste dans l'estomac, et rejoignent les cellules épithéliales de l'intestin pour une première étape de multiplication asexuée du parasite par schizogonie. Cinq stades entéro-épithéliaux morphologiquement différents ont été décrits dans l'intestin des félins au cours de cette étape, qui aboutit à la libération dans la lumière intestinale de mérozoïtes, eux-mêmes capable d'envahir de nouveaux entérocytes et de se multiplier à nouveau par schizogonie, ou de se différencier en formes sexuées. Ce

processus de différenciation se nomme gamétogénèse, et génère de nombreux macrogamètes (gamètes femelles) et seulement 2 à 5 % de microgamètes (gamètes mâles) (Ferguson, 2002). La fusion de ces deux formes sexuées au sein de l'entérocyte est à l'origine de la formation d'un oocyste diploïde immature qui sera émis sous forme non sporulée et non infectieuse dans l'environnement via les fèces du félin dès 3 à 7 jours et jusqu'à 20 jours après l'infection de ce dernier (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

Si la littérature sur le sujet a longtemps suggéré que l'émission d'oocystes faisait uniquement suite à la primo-infection de l'animal, il a été démontré que ce phénomène peut en fait survenir à nouveau en cas d'immunodépression, de pathologies intercurrentes voire de réinfections (Calero-Bernal & Gennari, 2019; Dubey, 1976; Zulpo et al., 2018).

La maturation des oocystes dans l'environnement s'effectue 1 à 5 jours après leur émission, en fonction des conditions climatiques (Jones & Dubey, 2010). Ils se divisent alors en deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes haploïdes. C'est seulement à l'issue de cette étape de sporulation que les oocystes deviennent infectants pour les hôtes intermédiaires et définitifs. Ils sont par ailleurs particulièrement résistants dans l'environnement – leur potentiel infectieux n'étant pas affecté par la dessiccation, l'humidité ou encore la chloration de l'eau – et peuvent rester viables pendant plusieurs mois (Shapiro et al., 2019). L'oocyste constitue ainsi une forme de dissémination du parasite, qui lui permet d'être présent même dans les écosystèmes les plus inattendus, comme au sein de la faune marine (Dubey et al., 2020).

Le large éventail des hôtes intermédiaires potentiels de *T. gondii* contraste avec le panel des hôtes définitifs se limitant aux félinidés. En effet, tous les animaux homéothermes, oiseaux et mammifères y compris l'humain, peuvent accueillir la multiplication asexuée du parasite.

Les hôtes intermédiaires peuvent se contaminer par voie orale, suite à l'ingestion d'oocystes dans l'environnement ou de kystes contenus dans des proies. La paroi des oocystes, comme celle des kystes, est lysée par les sucs gastriques, libérant leur contenu de sporozoïtes ou de bradyzoïtes pouvant envahir les entérocytes pour s'y différencier en tachyzoïtes. Le tachyzoïte est le stade de l'infection aiguë, capable de disséminer dans tout l'organisme et d'infecter tous les types cellulaires – en particulier les macrophages, les cellules épithéliales, les cellules musculaires et les neurones – pour s'y multiplier rapidement par endodyogenèse au sein de vacuoles parasitophores.

Chez un hôte gravide, il peut également traverser le placenta et entraîner l'infection congénitale du fœtus.

Après quelques jours d'infection aiguë, les tachyzoïtes se convertissent en bradyzoïtes et les kystes se développent et persistent, principalement dans les neurones, la rétine et les cellules musculaires de l'hôte. Cette persistance sous forme kystique est source non seulement de réactivation de l'infection en cas de défaut du système immunitaire – les bradyzoïtes pouvant alors à nouveau se convertir en tachyzoïtes –, mais également de transmission inter-hôtes par le biais du carnivorisme.

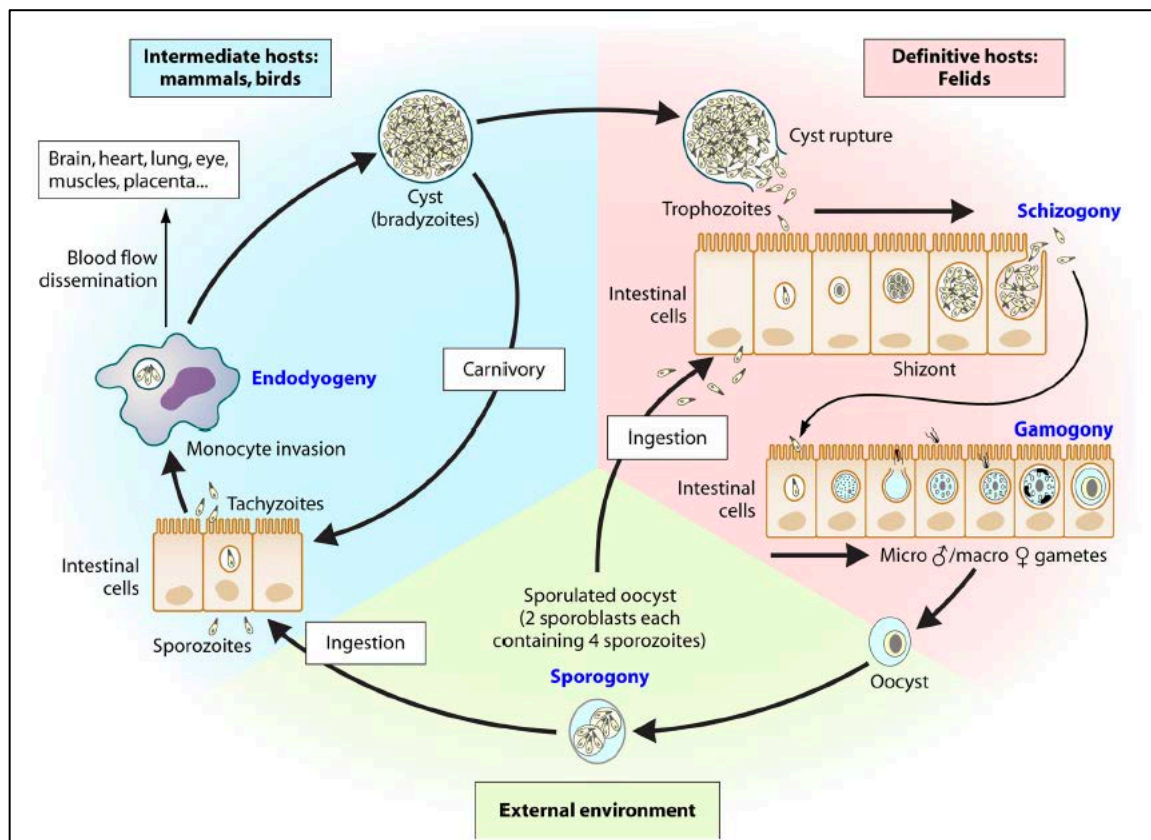


Figure 2. Cycle parasite de *T. gondii*.

D'après Robert-Gangneux & Dardé, 2012 (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

b) Morphologie des différents stades parasites

Gamètes

Les gamètes retrouvés au sein des entérocytes de l'hôte définitif sont issus de la différenciation des mérozoïtes.

Les macrogamètes ou gamètes femelles sont ovoïdes et mesurent 8 µm de long et 6 µm de large (Figure 3. A). Ils contiennent un gros noyau à la chromatine peu

condensée, et des vésicules comportant le matériel nécessaire à la formation de la paroi du futur oocyste (Attias et al., 2020; Ferguson & Dubremetz, 2014).

Les microgamètes ou gamètes mâles sont allongés et mesurent 6 µm de long par 2 µm de large (**Figure 3. B**). Ils contiennent un noyau à la chromatine condensée. L'extrémité antérieure est occupée par une plaque dense en électrons et nommée perforatorium. De cette extrémité partent également deux longs flagelles dirigés vers l'extrémité postérieure (Attias et al., 2020; Ferguson & Dubremetz, 2014).

Oocyste

L'oocyste est une structure ovoïde de 11 µm par 13 µm. À l'émission, il ne contient qu'un sporoblaste. Après maturation, les deux sporocystes qu'il contient mesurent chacun 8 µm par 6 µm et sont composés de quatre sporozoïtes au sein d'une même paroi (**Figure 3. C**). L'organisation des sporozoïtes est assez similaire à celle des bradyzoïtes et des tachyzoïtes. Ils sont toutefois plus allongés que les bradyzoïtes.

Les oocystes matures constituent la forme de persistance dans l'environnement, du fait de leur résistance.

Stades invasifs : tachyzoïte, bradyzoïte, mérozoïte et sporozoïte

Ces stades parasites sont relativement similaires en termes de morphologie et d'organisation cellulaire. Ils mesurent environ 7 µm de long par 2 µm de large et ont une forme arquée caractéristique (Ferguson & Dubremetz, 2014).

Ils sont délimités par un complexe de membranes, appelé pellicule, formé d'une membrane plasmique externe et du complexe membranaire interne, lui-même composé de deux membranes accolées absentes de la région la plus apicale et dans la partie la plus postérieure de la cellule (**Figure 3**).

Le noyau est localisé au centre du tachyzoïte mais en position plus postérieure chez les bradyzoïtes et sporozoïtes. La cellule parasite porte également une unique mitochondrie ramifiée, un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique. Un apicoplaste, organelle endosymbiotique délimitée par quatre membranes, est retrouvé en position latérale dans le parasite.

Des granules denses - organelles sécrétoires sphériques – et diverses vésicules contenant du calcium, des lipides ou de l'amylopectine, sont distribuées dans l'ensemble du zoïte. Les granules d'amylopectine sont plus nombreuses au sein des sporozoïtes et bradyzoïtes (Attias et al., 2020).

À l'extrémité apicale se trouve le complexe apical qui donne son nom au phylum. Cette structure indispensable à l'invasion cellulaire est illustrée sur la **Figure 4**.

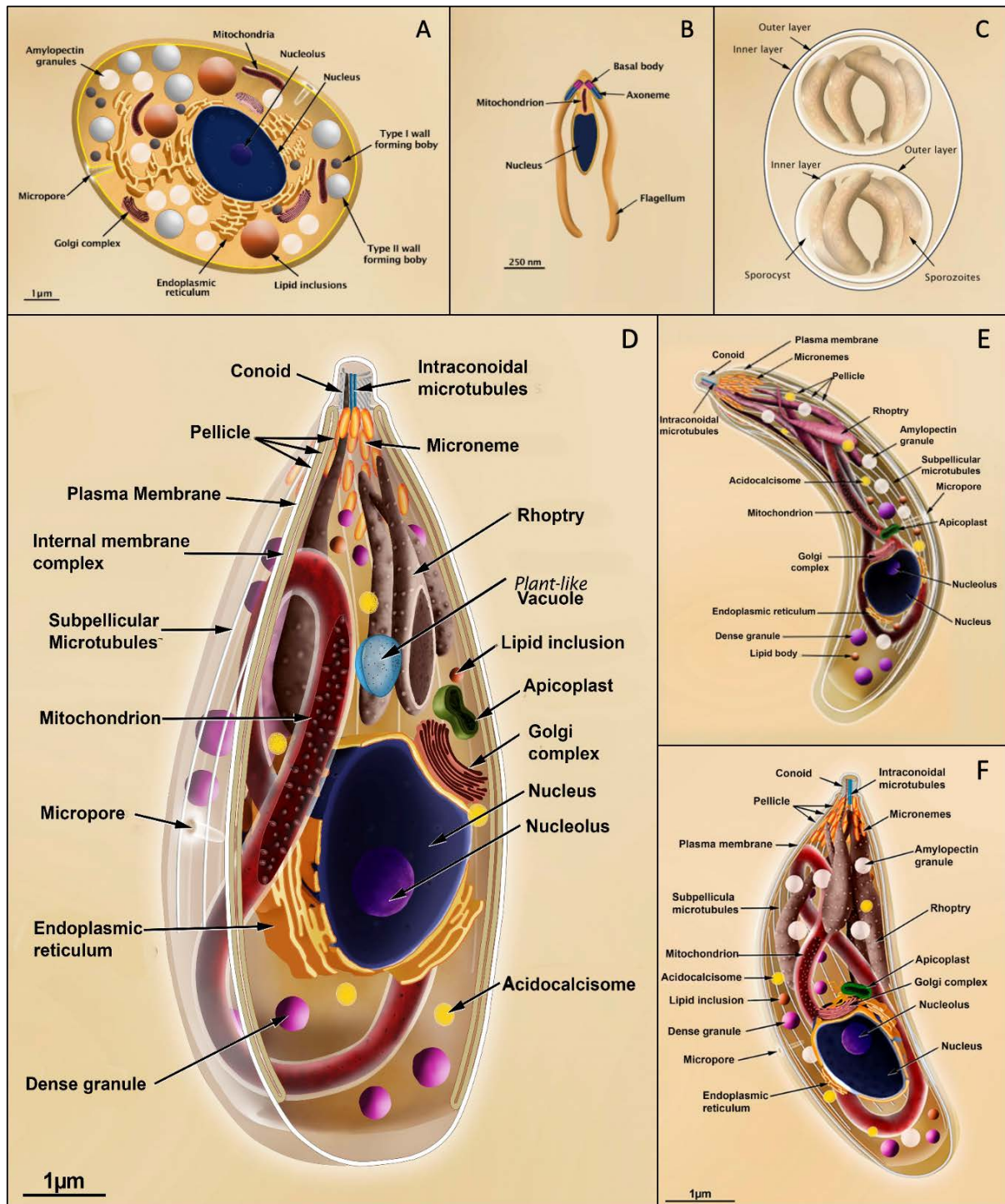


Figure 3. Morphologie et structure des différents stades parasites de *T. gondii*.

A. Macrogamète. B. Microgamète. C. Oocyste sporulé. D. Tachyzoïte. E. Sporozoïte. F. Bradyzoïte. Adapté de Attias et al., 2020 (Attias et al., 2020).

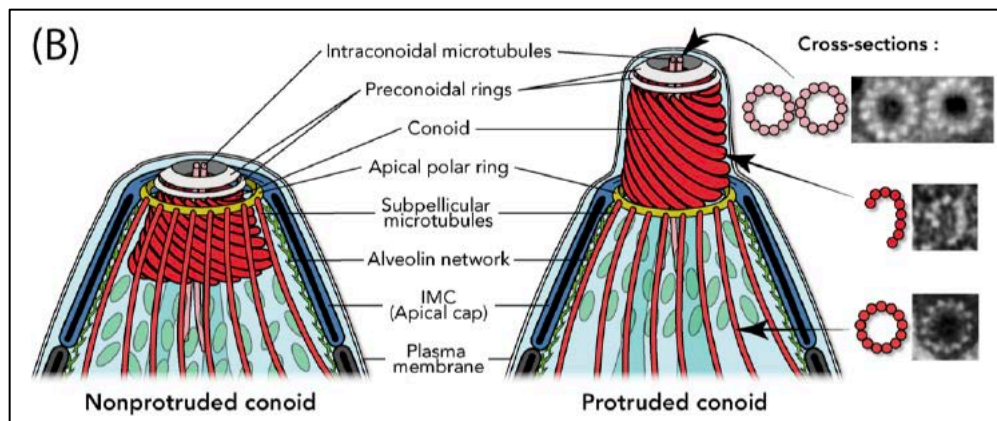


Figure 4. Complexe apical de *T. gondii*.

Le complexe apical de *T. gondii* comporte (i) un anneau polaire postérieur - duquel partent 22 microtubules situés sous le complexe membranaire interne – et deux anneaux polaires antérieurs, (ii) un conoïde à l'intérieur de l'anneau polaire. Cette structure en proto-filaments de tubuline est organisée en forme de cône autour de 2 microtubules internes, et peut faire protrusion à travers l'extrémité dépourvue de complexe membranaire interne (Morrisette & Sibley, 2002), (iii) des rhoptries, longs organelles sécrétoires en forme de massue et dédiées à l'invasion et à l'établissement du parasitisme intracellulaire (Ben Chaabene et al., 2020), (iv) de nombreux micronèmes, petites organelles sécrétoires en bâtonnet, dont le contenu protéique est nécessaire à l'adhésion à la cellule hôte. D'après Dos Santos Pacheco et al., 2020 (Dos Santos Pacheco et al., 2020)

2. *TOXOPLASMA GONDII* COMME MODELE EXPERIMENTAL

1. DES CARACTERISTIQUES COMMUNES AUX APICOMPLEXES

Bien que les Apicomplexes se distinguent les uns des autres par leur cycle de vie et leur spécificité d'hôtes, ils sont tous parasites intracellulaires obligatoires, et partagent pour la plupart, différents mécanismes et structures cellulaires. Ainsi *T. gondii* peut être envisagé comme un modèle d'étude de ces caractères communs qui sont autant de cibles thérapeutiques potentielles.

a) Mobilité et invasion de la cellule hôte

La mobilité et l'invasion cellulaire sont deux processus intimement liés et conservés au sein du phylum Apicomplexa, de sorte que les mécanismes adoptés par les stades invasifs de *T. gondii* (tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte) autrement appelés « zoïtes », et présentés ci-dessous, sont à quelques variations près, représentatifs de ceux utilisés par l'ensemble des Apicomplexes.

Les tachyzoïtes se déplacent à une vitesse de 1 à 3 $\mu\text{m/s}$ par un mouvement de glissement (*gliding*, en anglais), une mobilité originale substrat-dépendante propre aux Apicomplexes et caractérisée par trois formes distinctes de motilité : le glissement circulaire, la rotation verticale et la rotation hélicoïdale (Håkansson et al., 1999). À

l'origine de ce mouvement, une machinerie moléculaire appelée glidéosome, constituée d'un moteur actine-myosine ancré dans le complexe membranaire interne, et qui prend appui sur des protéines adhésives sécrétées au pôle apical par la décharge des micronèmes pour propulser le parasite vers l'avant (Keeley & Soldati, 2004). Une fois la liaison à la cellule hôte initiée via les protéines des micronèmes, les rhoptries prennent le relais et déchargent à leur tour le contenu protéique de leur col, incluant les protéines du complexe RON qui s'associent à la protéine micronémale AMA-1 pour former une jonction mobile (JM) entre le parasite et la cellule hôte (Aikawa et al., 1978; Alexander et al., 2005; Besteiro et al., 2009). L'entrée active du parasite à travers cette JM entraîne l'invagination de la membrane de la cellule hôte, qui constituera la membrane de la vacuole parasitophore, à l'intérieur de laquelle le parasite se multiplie par endodyogénie et sécrète le contenu protéique de ses granules denses (notamment les protéines GRA). Pendant le processus d'invasion, le tachyzoïte injecte également dans la cellule hôte des vésicules issues du bulbe des rhoptries et contenant des protéines (ROP) et des lipides. Celles-ci participent notamment à la formation de la vacuole parasitophore (Boothroyd & Dubremetz, 2008). Le processus d'invasion de la cellule hôte est illustré sur la **Figure 5**.

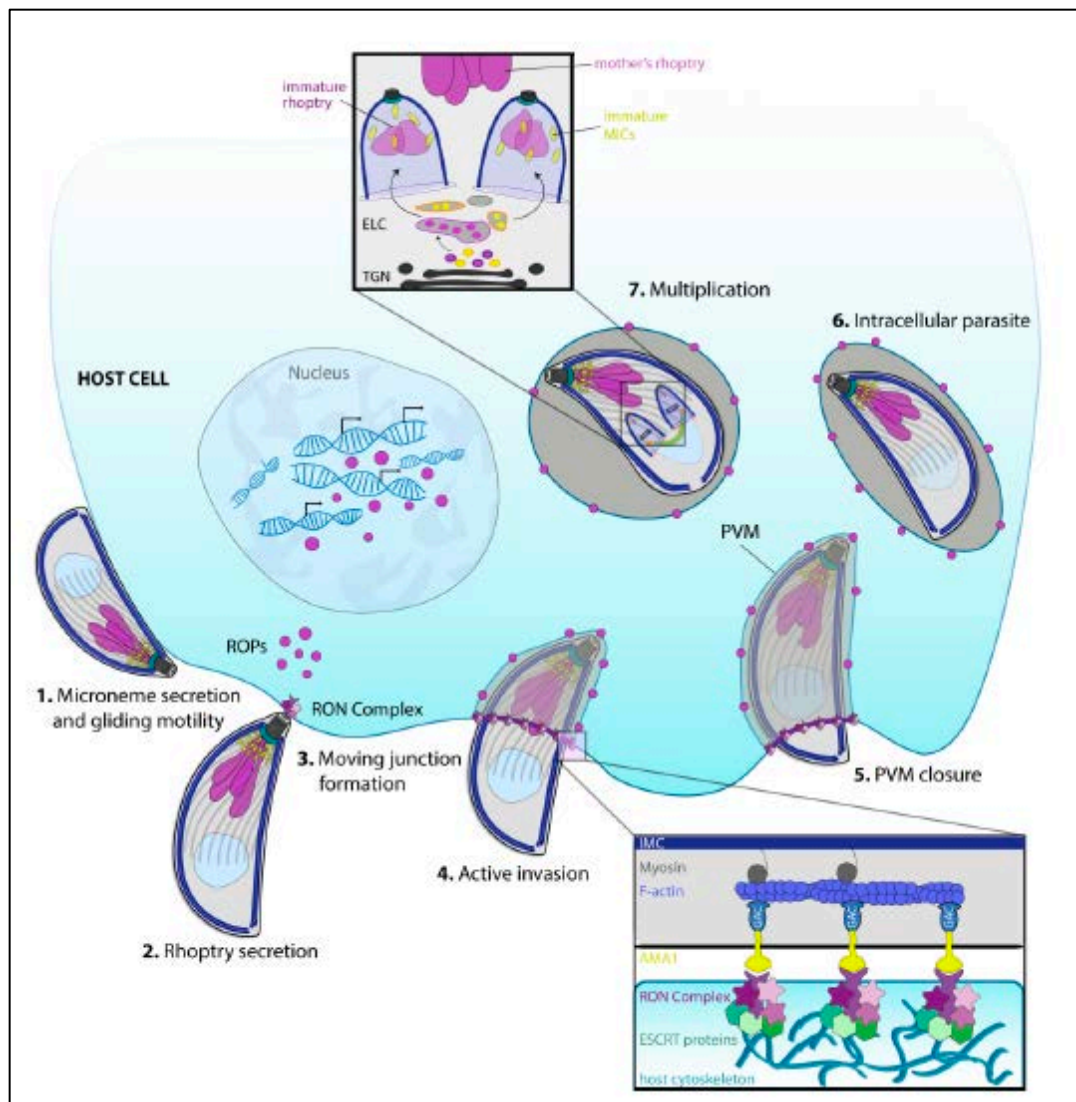


Figure 5. Processus d'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*.

L'invasion cellulaire est un processus actif et orchestré avec la décharge séquentielle du contenu des micronèmes puis des rhoptries, permettant la formation de la JM entre le parasite et son hôte. *T. gondii* exerce ensuite sa mobilité par gliding pour pénétrer à l'intérieur de la cellule hôte via la JM et entraîner l'invagination de la membrane de la cellule hôte à l'origine de la formation de la membrane de la vacuole parasitophore. D'après Ben Chaabene et al., 2020 (Ben Chaabene et al., 2020).

b) Apicoplaste

L'apicoplaste est un plaste vestigial issu de l'endosymbiose secondaire d'une algue rouge par la cellule eucaryote ancêtre des Apicomplexes (Köhler et al., 1997; McFadden et al., 1996). L'organite possède un génome circulaire de 35 kb et est entouré de 4 membranes. Il a perdu ses compétences de photosynthèse, mais est cependant indispensable à la survie des organismes qui en sont dotés (C. Y. He et al., 2001). Il est en effet impliqué dans la synthèse des acides gras, des isoprénoïdes ou encore de l'hème (Jomaa et al., 1999; Ralph et al., 2004; Waller et al., 1998).

L'apicoplaste est un organite commun aux Apicomplexes, et ceux qui comme *Cryptosporidium*, en sont dépourvus, l'ont probablement perdu au cours de l'évolution (G. Zhu et al., 2000). D'autre part, via un processus de transfert de gènes, le génome nucléaire des Apicomplexes se trouve également enrichi de gènes provenant de l'algue originelle, et la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de l'apicoplaste est plus proche de celle des bactéries que de celle des eucaryotes. Ces éléments ont ouvert la voie à la recherche de nouvelles thérapeutiques ciblant l'apicoplaste (McFadden & Yeh, 2017).

2. MODELE EXPERIMENTAL

T. gondii s'est imposé comme un modèle d'étude dans son phylum car ce parasite se cultive aisément *in vitro*, son génome parmi les premiers à avoir été révélé, se manipule facilement et de nombreux outils d'exploration de ses fonctions biologiques (par exemple des anticorps) sont disponibles. Cependant si *T. gondii* bénéficie de modèles murins pertinents pour l'étude des stades chroniques, son cycle sexué reste peu étudié car ce dernier ne peut se produire que via l'infection de chats et pour des raisons éthiques évidentes, peu d'équipes se sont engagées dans cette voie.

a) Culture

T. gondii présente l'avantage de se cultiver facilement *in vitro* sur cellules nucléées, d'autant plus lorsqu'il s'agit de lignées de laboratoire adaptées à la culture *in vitro*. Les souches de laboratoire les plus fréquemment utilisées appartiennent aux lignées clonales de types 1, 2 et 3. Elles diffèrent principalement par leur phénotype de virulence déterminé chez la souris. Les souches de type 1 (RH, GT1) entraînent rapidement la mort de l'animal après l'inoculation d'à peine quelques tachyzoïtes viables, et ce sans donner lieu à la formation de kystes, tandis que les souches de type 2 (ME49, Prugniaud ou Pru, 76K) et de type 3 (VEG, CTG) sont moins virulentes et entraînent une infection chronique caractérisée par la présence de kystes notamment intracérébraux (Sibley & Boothroyd, 1992). Il faut cependant noter que la virulence est variable en fonction de l'hôte. D'importantes variations d'expression sont même notées entre différentes sous-espèces de souris (Hassan et al., 2019).

Des changements phénotypiques liés à de nombreux passages en culture cellulaire ou *in vivo* sont également observés pour certaines de ces souches. La souche RH par exemple a perdu sa capacité à produire des oocystes chez le chat (Saraf et al., 2017). D'autres lignées, comme la souche CTG, peuvent avoir une moindre propension à se différencier et à former des kystes *in vivo*.

Il est également possible de provoquer la différenciation *in vitro* par divers procédés induisant un stress. Ainsi l'augmentation du pH ou de la température du milieu, la déprivation en nutriments ou certains traitements chimiques peuvent déclencher la conversion et l'expression de gènes spécifiques du stade bradyzoïte (Cerutti et al., 2020; Jeffers et al., 2018). L'induction concomitante de gènes de réponse au stress peut cependant limiter l'intérêt de ce type de modèle pour l'étude de la différenciation et de la kystogénèse.

En 2009, notre équipe a montré le potentiel du composé FR235222 à induire l'expression de gènes spécifiques du bradyzoïte en culture, en inhibant l'histone désacétylase HDAC3 (Bougdour et al., 2009). L'expression de ces mêmes gènes peut également être obtenue en déplétant la cellule parasitaire de la protéine MORC, qui agit en amont de HDAC3 en recrutant cette dernière (Farhat et al., 2020).

Enfin, la différenciation peut aussi intervenir spontanément *in vitro* lorsque le parasite est cultivé sur cellules hautement différenciées voire sénescents (Mouveaux et al., s. d.).

L'expansion de la population de *T. gondii* est également possible *in vivo* dans de nombreux modèles animaux. La réponse à l'infection varie alors selon l'espèce hôte et les modalités d'infection. Le modèle murin est de loin le plus utilisé. L'infection est principalement menée par injection intra-péritonéale de tachyzoïtes, mais en fonction de ce que l'on souhaite étudier, il est également possible d'infecter par voie orale avec des kystes contenant des bradyzoïtes. Ce mode d'infection est cependant moins reproductible en raison d'une quantité de bradyzoïtes variable en fonction des kystes (Lüder et al., 2014).

b) Outils d'étude moléculaire

T. gondii possède un génome d'environ 65 Mb codant plus de 8920 gènes répartis sur 13 chromosomes (Berná et al., 2021; Lorenzi et al., 2016). Une base de données dédiée au parasite, ToxoDB, offre un accès gratuit aux séquences génomiques annotées de différentes souches dont la souche de référence ME49, ainsi qu'à des données transcriptomiques et autres données « omic » (Gajria et al., 2008).

Le tachyzoïte est génétiquement modifiable. Les protocoles de transfection d'ADN exogène et plusieurs marqueurs de sélection sont disponibles. Ainsi l'allèle de la dihydrofolate réductase (DHFR) confère une résistance à la pyriméthamine, et l'intégration de l'hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HXGPRT) dans des souches qui en sont dépourvues permet la sélection des clones positifs en utilisant l'acide mycophénolique et la xanthine (Jacot et al., 2020).

T. gondii se distingue d'autres Apicomplexes comme *Plasmodium* par une réparation préférentielle de son ADN endommagé par un mécanisme de jonction d'extrémités non homologues (*Non-homologous end joining*, NHEJ) qui dépend de Ku70/Ku80, rendant la recombinaison homologue inefficace. Pour améliorer cette dernière, des lignées RH et Pru où le gène Ku80 a été inactivé ont été générées pour avoir une activité NHEJ considérablement réduite, et faciliter le remplacement ou la mutation ciblée des gènes par recombinaison homologue (Fox et al., 2009, 2011).

Plus récemment, l'outil CRISPR/Cas9 a permis une amélioration significative de l'édition du génome de *T. gondii* en dirigeant l'action de l'endonucléase Cas9 de *Streptococcus pyogenes* vers un locus spécifique par co-expression avec un ARN guide (Jinek et al., 2012; Shen et al., 2014). L'édition à grande échelle a permis ainsi de caractériser l'essentialité des gènes dans le tachyzoïte (Sidik et al., 2016).

Différents systèmes ont également été développés pour réguler précisément et de façon ciblée l'expression génique chez *T. gondii*. Le système Auxin Inducible Degron (AID) par exemple, est un système de déplétion inductible issu des plantes, qui permet d'induire l'ubiquitination et la dégradation des protéines marquées d'un motif spécifique mAID (pour mini-AID) par le protéasome simplement par l'ajout de l'hormone végétale auxine ou de son analogue, l'acide indol-3-acétique (IAA) (Nishimura et al., 2009). Ce système a été transposé à *T. gondii* et permet une déplétion réversible tout en conservant une expression sous le contrôle du promoteur naturel (Brown et al., 2018; T. A. Smith et al., 2022).

3. STRUCTURE DES POPULATIONS PARASITAIRES

1. METHODES D'ETUDE

Si l'intérêt pour la structure des populations de *T. gondii* a pris de l'ampleur dès les années 90 avec l'émergence de l'hypothèse d'un lien entre la clinique et la souche parasitaire impliquée, les stratégies et les techniques de génotypage ont évolué au cours du temps (M. L. Dardé et al., 1992; Howe & Sibley, 1995). Les méthodes les plus utilisées et les plus pertinentes en termes de discrimination sont brièvement présentées ci-dessous.

a) RFLP

La méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP, de l'anglais *Restriction Fragment Length Polymorphism*) est l'une des premières utilisées pour l'étude génotypique de *T. gondii*. Cette méthode s'appuie sur la digestion enzymatique de séquences d'ADN par des enzymes de restriction, qui permet

d'obtenir des fragments de tailles différentes en fonction des allèles (Botstein et al., 1980). Elle présente l'avantage d'être simple et peu coûteuse. En fonction des études, le choix et le nombre de marqueurs utilisés diffèrent (M.-L. Dardé et al., 2014).

b) Marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont de courtes séquences répétées un nombre variable de fois. Ces régions réparties sur l'ensemble du génome sont très polymorphes, et donc idéales pour le génotypage de souches. Là aussi, les marqueurs ont pu différer dans leur nature et dans leur nombre, en fonction des études. Le protocole le plus utilisé consiste en une PCR multiplexe ciblant 15 marqueurs microsatellites à la fois (Ajzenberg et al., 2010).

c) MLST et séquençage du génome entier

Le typage par séquençage MLST (MultiLocus Sequencing Typing) consiste à comparer les séquences nucléotidiques d'introns de gènes de ménage. Avec la diminution des coûts liés au séquençage, cette méthode tend à se démocratiser (M.-L. Dardé et al., 2014). Le séquençage du génome entier est également utilisé dans quelques études récentes (Lorenzi et al., 2016). Cette méthode est la plus résolutive à l'heure actuelle.

2. ÉTAT DES CONNAISSANCES

Les premiers travaux concernant la structure des populations de *T. gondii* s'appuyaient sur l'étude d'isolats issus essentiellement d'humains ou d'animaux domestiques de l'hémisphère nord (Howe & Sibley, 1995). Ils ont mis en évidence l'existence de 3 lignées clonales prédominantes désignées type 1, 2 et 3, qui prédominent largement en Europe et en Amérique du Nord (Howe & Sibley, 1995), présentant des phénotypes de virulence considérablement différents chez la souris (Howe et al., 1996; Sibley & Boothroyd, 1992). Les études s'intéressant à des souches d'origines géographiques et de sources plus variées ont permis de montrer une structure plus complexe. Une quatrième lignée clonale appelée type 12 et issue d'une recombinaison entre un type 2 et une autre lignée, prédomine en fait au sein de la faune sauvage en Amérique du Nord (Khan, Dubey, et al., 2011). De plus, hors Europe et Amérique du Nord, la diversité génétique s'avère importante, notamment en Amérique du Sud (Ajzenberg et al., 2004; Khan et al., 2006). Ce modèle à géographie variable a été confirmé par les méthodes plus résolutes : le typage MLST de 138 isolats collectés à travers le monde a montré l'existence de 15 haplogroupes répartis au sein de 6 clades différentes, avec une nette prédominance de quelques lignées clonales dans l'hémisphère Nord et une grande diversité de génotypes rares ailleurs.

l'opposé, l'expansion des lignées clonales est quant à elle estimée à il y a environ 10 000 ans (Su et al., 2003). Ainsi, il a été démontré que les trois lignées clonales partagent une version monomorphe commune du chromosome 1a, ce qui suggère que la combinaison d'allèles portée par ce chromosome est responsable de l'émergence récente et rapide des lignées clonales (Khan, Miller, et al., 2011). Aussi, la survenue de cet événement coïncide-t-il avec l'apparition de l'agriculture, de l'élevage et de la domestication d'animaux de compagnie, activités humaines qui favorisent le contact entre hôtes intermédiaires potentiels et hôtes définitifs de *T. gondii*. Ces nouvelles conditions ont pu avantager considérablement les parasites adaptés à ces partenaires domestiques (chats, rongeurs...) (Sibley & Ajioka, 2008). De plus, la reproduction sexuée du parasite n'est que facultative – *T. gondii* pouvant se transmettre entre hôtes intermédiaires par carnivorerisme – et les chances d'échanges génétiques sont relativement limitées hors Amérique du Sud (Sibley & Ajioka, 2008). La conjonction de ses différents éléments explique l'expansion clonale de certaines lignées, et la distribution observée dans l'hémisphère nord.

4. INTERACTIONS ENTRE *T. GONDII* ET SON HÔTE

Nos connaissances des interactions entre *T. gondii* et son hôte sont issues d'expérimentations *in vitro* sur lignées cellulaires y compris humaines, ou d'études *in vivo* et *ex vivo* menées chez les rongeurs. Ce modèle animal est pertinent car il correspond à l'hôte intermédiaire naturel du parasite au cours de son cycle (Gazzinelli et al., 2014), mais l'extrapolation à l'humain peut être imprécise, les mécanismes pouvant varier en fonction de l'hôte tout comme du tissu ou du type cellulaire infecté.

Les paragraphes ci-dessous présentent ainsi les grandes lignes des modalités de dissémination du parasite et de la réponse immune de l'hôtes telles qu'elles sont comprises à ce jour. Une attention particulière sera accordée aux interactions hôte-pathogène en rapport avec la persistance, notamment au niveau du système nerveux central.

1. DISSEMINATION CHEZ L'HÔTE

La majeure partie des infections par *T. gondii* fait suite à l'ingestion des formes infectieuses sporozoïtes ou bradyzoïtes contenues respectivement au sein d'oocystes ou de kystes tissulaires. Dans l'intestin grêle, ces zoïtes peuvent soit infecter les cellules épithéliales et s'y multiplier, soit directement traverser la couche épithéliale pour rejoindre la *lamina propria* et infecter les cellules dendritiques et macrophages qui s'y trouvent (Matta et al., 2021). De là, le parasite peut disséminer par voie lymphatique et sanguine à travers l'organisme au cours de l'infection aiguë, et peut

notamment rejoindre le système nerveux central (SNC). *T. gondii* fait en effet partie des rares microorganismes capables d'atteindre cette zone de « privilège immun » protégée entre autres par la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Plusieurs mécanismes illustrés sur la **Figure 7** ont été proposés pour expliquer le passage de *T. gondii* au parenchyme cérébral, à savoir (i) la transmigration paracellulaire et le passage direct du parasite entre les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique par le biais d'interactions entre des adhésines parasitaires et endothéliales (Barragan et al., 2005), (ii) la migration transcellulaire via l'invasion de la cellule endothéliale, la multiplication parasitaire au sein de celle-ci et l'émergence des parasites néoformés par l'extrémité basolatérale (Konradt et al., 2016) et (iii) la stratégie du « cheval de Troie » via le passage de leucocytes parasités, notamment monocytes CD11b⁺ et cellules dendritiques (Courret et al., 2006; Lachenmaier et al., 2011; Lambert et al., 2006). Il est possible que le parasite puisse combiner ces différents mécanismes pour pénétrer le système nerveux central.

Si l'infection aiguë est propice à la dissémination du parasite dans différents organes, certaines données et notamment des expériences de bioluminescences menées chez la souris, suggèrent que le cerveau est le principal organe impliqué dans la formation de kystes (Di Cristina et al., 2008).

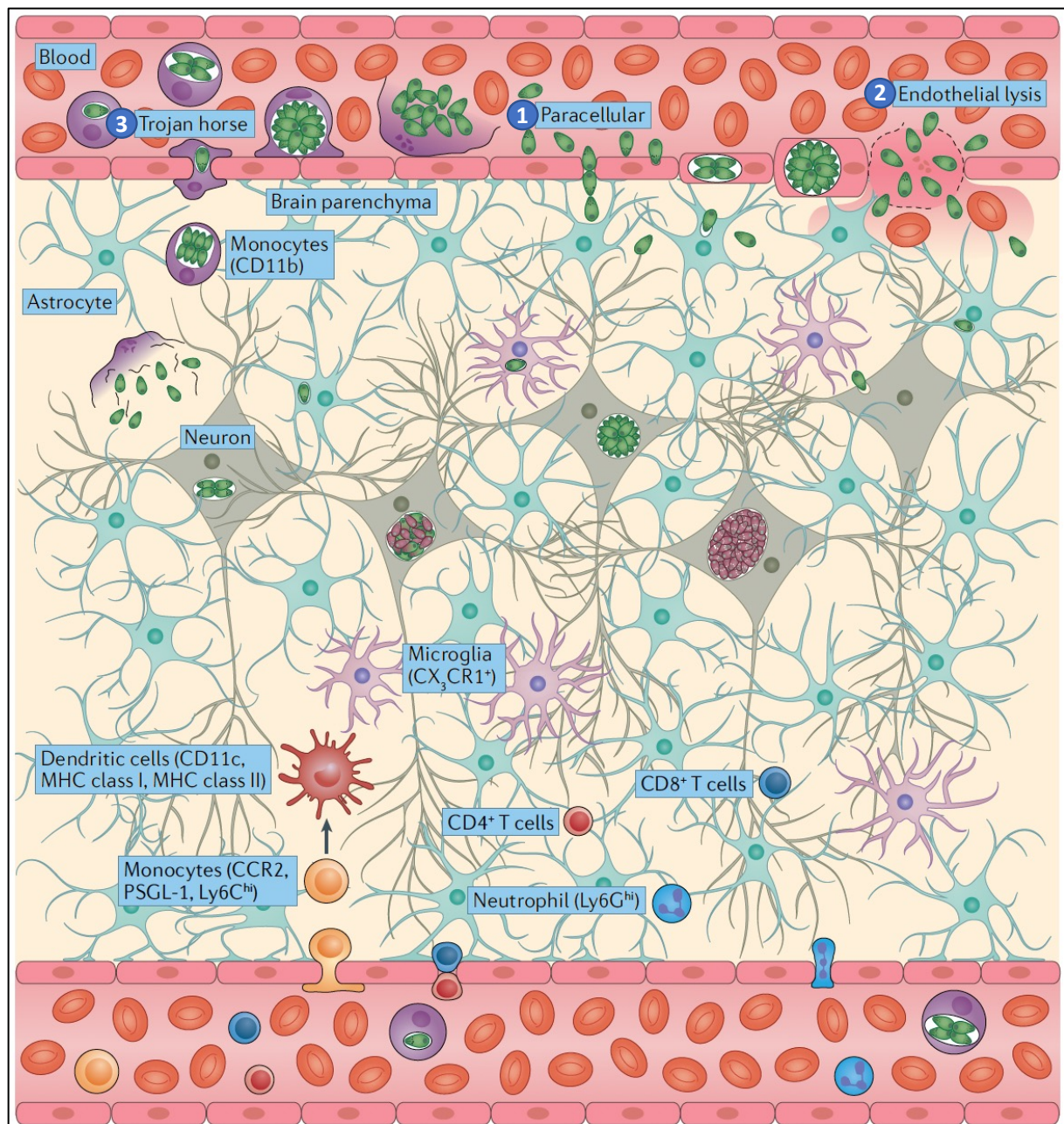


Figure 7. Atteinte du système nerveux central par *T. gondii*.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'invasion du SNC par *T. gondii* : la transmigration paracellulaire (1), la migration transcellulaire (2) et le mécanisme du « cheval de Troie » (3). Au sein du parenchyme, les parasites infectent essentiellement les neurones, et s'y différencient, formant des kystes persistants dans ces cellules. En réponse à l'infection, des cellules immunitaires, notamment LT CD4⁺ et CD8⁺, monocytes exprimant CCR2 et cellules dendritiques, sont recrutées au niveau du SNC. Adapté de Matta et al., 2021 (Matta et al., 2021).

2. RÉPONSE IMMUNE

a) Généralités

L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des pathogènes. Le déclenchement de cette réponse varie en fonction des hôtes. Chez la souris, les

récepteurs Toll-like 11 et 12 (TLR11 et TLR12) à la surface des cellules immunitaires reconnaissent la profiline parasitaire, ce qui entraîne l'activation des facteurs de transcription NF- κ B par le biais des molécules adaptatrices MyD88, et ainsi la production d'interleukine 12 (IL-12) (W. A. Andrade et al., 2013; Yarovsky et al., 2005). La libération d'IL-12 stimule la synthèse par les lymphocytes T (LT) et NK, d'interféron γ (IFN- γ), qui joue un rôle crucial dans la réponse à l'infection par *T. gondii* (M.-A. Hakimi et al., 2017; Mordue & Hunter, 2020). En effet, l'IFN- γ active STAT1 qui augmente la production d'oxyde nitrique en induisant l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), et induit également différentes protéines de liaison au guanylate (GBP) et GTPase liées à l'immunité (IRG), ce qui participe activement à restreindre l'infection (W. Zhu et al., 2019).

Les récepteurs TLR11 et TLR12 sont absents chez l'humain, ce qui implique des modalités de reconnaissance différents. Aussi, l'alarmine S100A11 libérée par les cellules infectées a-t-elle récemment été identifiée comme un facteur capable d'induire la production de la chimiokine CCL2 pour recruter les monocytes (Safronova et al., 2019) (**Figure 8**). D'autre part, chez l'humain les IRG et les GBP ne semblent pas jouer un rôle aussi important que chez la souris dans l'immunité anti-*Toxoplasma* (M.-A. Hakimi et al., 2017). L'IFN- γ induit une réponse pouvant varier en fonction du type cellulaire, et passant par l'ubiquitination et l'autophagie (Selleck et al., 2015) ou encore l'induction de l'indoleamine-2,3-dioxygénase 1 (IDO) et la déprivation en tryptophane (Pfefferkorn, 1984). La mort cellulaire en lien avec NALP1 et l'inflammasome participe également à l'immunité innée lors de l'infection par *T. gondii* (Witola et al., 2011). Une réponse innée indépendante de l'IFN- γ est également décrite par le biais du TNF α et de l'IL-6 (Chao et al., 1994), ainsi que par la stimulation des macrophages infectés par CD40 qui induit l'autophagie (R. M. Andrade et al., 2006, p. 40).

Lors de l'infection par *T. gondii*, les cellules dendritiques jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II, et initient une réponse immune adaptative en activant les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺. Les LT CD8⁺ ainsi activés sont capables d'éliminer les cellules abritant le parasite et produisent également de l'IFN- γ et du TNF α . Les LT CD4⁺ se différencient notamment en LT helper 1 (Th1) qui produisent également ces cytokines (Blanchard et al., 2020).

L'infection par *T. gondii* génère ainsi des phénomènes inflammatoires. Au niveau du SNC, ces phénomènes peuvent avoir des conséquences manifestes, et ont notamment été corrélés à des modifications comportementales chez la souris (Boillat

et al., 2020). Pour limiter les dommages, différentes molécules immunomodulatrices sont sécrétées par les cellules immunitaires recrutées ou par les astrocytes ou neurones eux-mêmes. Ainsi, la libération d'IL-10 par les monocytes (Biswas et al., 2015) ou de TGF β par les astrocytes (Cekanaviciute et al., 2014), ont pu être rapportées.

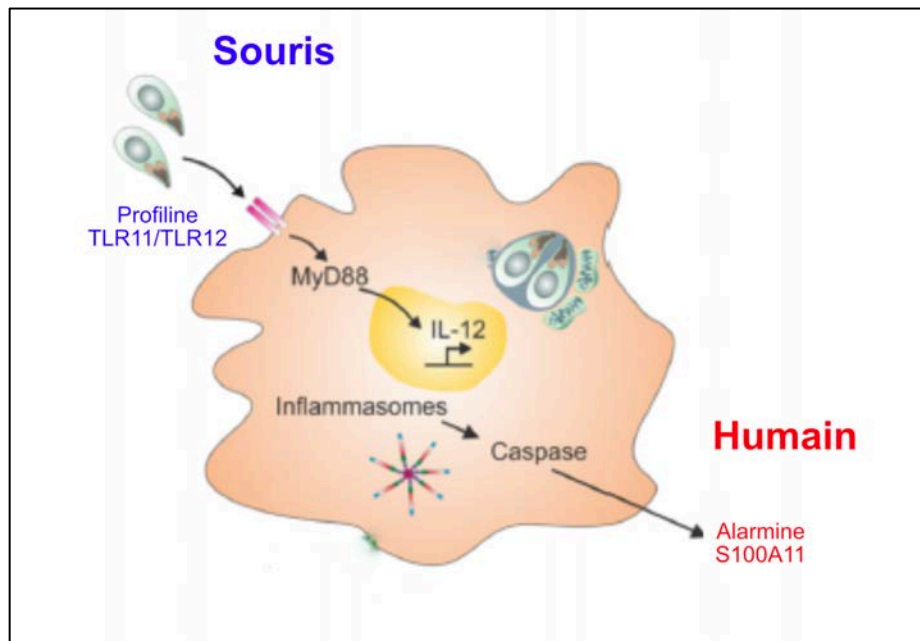


Figure 8. Reconnaissance immunitaire de *T. gondii* en fonction de l'hôte.

La reconnaissance immunitaire de *T. gondii* passe essentiellement par la reconnaissance de la profiline parasitaire par les TLR11/12 chez la souris, alors que ces récepteurs sont absents chez l'humain. L'infection peut activer l'inflammasome chez la souris et chez l'humain. Chez l'humain, les monocytes infectés sécrètent l'alarmine S100A11 sous l'effet des caspases et cela entraîne une réponse chimiokine. Adapté de Mordue & Hunter, 2020 (Mordue & Hunter, 2020).

b) Réponse immunitaire humorale

La réponse immunitaire humorale correspond au versant de l'immunité adaptative reposant sur l'intervention des anticorps produits par les lymphocytes B. Elle constitue une ligne de défense essentielle vis-à-vis des pathogènes à développement extracellulaire mais participe également à la défense contre des pathogènes intracellulaires recourant à un passage extracellulaire pour l'invasion de nouvelles cellules.

Le développement de cette réponse passe par la reconnaissance d'un antigène natif par un lymphocyte B du fait de l'affinité de l'anticorps qu'il exprime à sa surface pour cet antigène (BcR), et nécessite généralement l'intervention de lymphocyte T activés

(réponse B thymodépendante), bien que dans certain cas une réponse lymphocytaire B puisse se mettre en place sans co-stimulation lymphocytaire T (réponse B thymodépendante) (O'Connor et al., 2003).

Dans le cas de la réponse B thymodépendante, suite à l'activation du LB par l'antigène, ce dernier sera endocyté avec le BcR et sera dégradé en peptides prêts à être présentés à la surface par les molécules du CMH de classe II, ce qui permettra leur reconnaissance par un lymphocyte T de même affinité préalablement activé. Cela engendre l'expression à la surface du LT de CD40-L qui reconnaît CD40 à la surface du LB, ce qui donne lieu à un signal de co-stimulation qui agit de concert avec la libération d'interleukines par le LT pour activer le LB et promouvoir la prolifération des LB, la commutation isotypique qui permet la synthèse d'anticorps autres que IgM et la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'anticorps ou en lymphocyte B mémoires rapidement activable en cas de nouvelle rencontre avec le même antigène (Gray et al., 1996).

Il est à noter qu'au fil du temps, une maturation de l'affinité des LB pour l'antigène va s'opérer suite à un processus d'hypermutations somatiques permettant l'apparition rapide et importante de mutations au niveau des gènes des régions variables des Ig, suivi d'une sélection des LB portant les récepteurs les plus affins pour l'antigène (**Figure 9**) (Di Noia & Neuberger, 2007).

Les IgM sont les premiers anticorps produits par les cellules B activées. Ce sont ensuite les IgG, les IgA et les IgE qui seront libérés après commutation isotypique. Les IgG sont largement prédominant dans la circulation, du fait notamment de leur plus longue durée de vie.

Si la réponse immunitaire cellulaire et l'IFN gamma jouent un rôle crucial dans la défense de l'hôte vis-à-vis de l'infection par *T. gondii*, cette dernière engendre également une réponse immunitaire humorale et la production de différents isotypes d'anticorps (IgM, IgA ou encore IgG) dirigés contre le parasite et qui agissent en neutralisant le pathogène, en facilitant sa phagocytose ou en activant le complément qui le détruira.

Cette réponse humorale joue un rôle fonctionnel évident puisqu'il a été démontré qu'elle était nécessaire à la survie, et des souris qui en sont dépourvues meurent en 3 à 4 semaines après l'infection (Kang et al., 2000). Un défaut de l'immunité humorale participe également à l'échec de contrôle de l'infection en cas de déficience en LT CD4 (L. L. Johnson & Sayles, 2002). Enfin il a récemment été démontré qu'elle

contribue à la protection contre une infection secondaire par *T. gondii* (Souza et al., 2021).

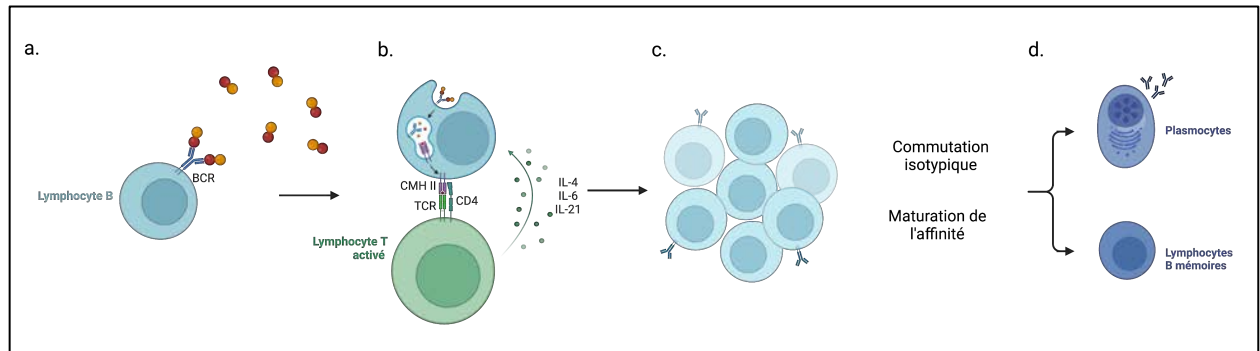


Figure 9. Représentation schématique du processus d'activation des LB et de production des anticorps.

3. DEFENSES PARASITAIRES

La première ligne de défense de *T. gondii* face au système immunitaire de l'hôte est la vacuole parasitophore. Cette dernière constitue en effet une séparation physique entre le parasite et le cytoplasme de la cellule hôte, et une niche pour la réplication et la survie du parasite (Clough & Frickel, 2017). De plus, la formation de membranes intravacuolaires régule la présentation de GRA6, un antigène dominant de *T. gondii*, par le CMH-1 aux lymphocytes T CD8⁺ (Lopez et al., 2015).

En plus de cette barrière mécanique, le parasite peut également produire différents effecteurs pour répondre aux mécanismes immunitaires de l'hôte.

Pour éviter l'activité d'autophagie, les protéines des micronèmes MIC3 et MIC6 peuvent induire la phosphorylation de l'EGFR de la cellule hôte et activer la voie de signalisation PI3K/Akt et d'une part limiter l'expression de la protéine LC3 impliquée dans la formation d'autophagosomes (Muniz-Feliciano et al., 2013), et d'autre part activer mTORC1, ce qui réduit également la formation des autophagosomes (J. Kim et al., 2011).

Chez la souris, les protéines de rhoptrie ROP5, ROP17 et ROP18 s'associent en complexes qui ciblent les IRG et régule la virulence (Behnke et al., 2012; Etheridge et al., 2014; Steinfeldt et al., 2010).

T. gondii sécrète également des effecteurs capables d'interagir avec des facteurs de transcription au sein du noyau de la cellule hôte. Parmi ces derniers, la protéine ROP16 active STAT3 et STAT6, ce qui diminue la production d'IL-12 en cas d'infection par les souches de type 1 ou 3 (Saeij et al., 2007; Yamamoto et al., 2009).

La réponse immune médiée par l'IFN- γ peut quant à elle être contrée par TgIST (*T. gondii inhibitor of STAT1 transcriptional activity*) qui inhibe STAT1 (Gay et al., 2016). D'autre part, GRA16 module l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et la voie de suppression de tumeur p53 (Bougdour et al., 2013, p. 16). Dans les macrophages infectés, GRA18 est sécrétée dans le cytoplasme de la cellule hôte et induit l'expression de chimiokines telles que CCL17 et CCL22, impliquées dans la réponse anti-inflammatoire (H. He et al., 2018). Plus récemment, l'aptitude de la protéine parasitaire exportée TEEGR à contrer la voie de signalisation de NF- κ B a été rapportée (Braun et al., 2019).

À l'inverse, certains effecteurs parasitaires sont, de façon surprenante, impliqués dans la promotion de la réponse immune de l'hôte. Ainsi, la protéine issue des granules denses GRA15 du type 2, localisée à la surface de la vacuole parasitophore, est capable d'activer le facteur de transcription NF- κ B et donc la synthèse d'IL-12 (Rosowski et al., 2011). La protéine GRA24 est quant à elle transloquée dans le noyau de la cellule hôte, où elle active la MAPK p38, ce qui augmente l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-12 (Braun et al., 2013).

La conversion du tachyzoïte en bradyzoïte est également un moyen pour *T. gondii* de persister chez ces hôtes en limitant l'impact du système immunitaire. Cependant, bien que la plupart des mécanismes de défense du parasite vis-à-vis du système immunitaire s'appliquent au stade tachyzoïte – notamment parce que la paroi du kyste limite la sécrétion de certains effecteurs dans la cellule hôte (Krishnamurthy & Saeij, 2018)-, l'export et l'activité de certains effecteurs comme TgIST se poursuivent au-delà des premiers stades de l'infection de la cellule hôte (Mayoral et al., 2020). Le bradyzoïte sécrète également TgNSM qui agit de concert avec TgIST pour inhiber les gènes régulés par l'IFN- γ impliqués dans la mort cellulaire (Rosenberg & Sibley, 2021). Aussi, la protéine MAG1 sécrétée par le tachyzoïte aussi bien que par le bradyzoïte, joue un rôle immunomodulateur et favorise la survie du parasite et l'établissement d'une infection latente (Tomita et al., 2021).

II. KYSTE ET DIFFERENCIATION EN BRADYZOÏTE

La persistance de *T. gondii* sous forme kystique est évoquée pour la première fois dans la littérature en 1928 (Levaditi et al., 1928), mais ce n'est qu'à partir des années 50 que le kyste commencera à être décrit morphologiquement, et le terme bradyzoïte (de *brady* : lent en grec) sera proposé en 1973 pour décrire le stade parasitaire qu'il contient (Frenkel, 1973).

Le processus de conversion du tachyzoïte en bradyzoïte et la formation du kyste qui protège ce dernier, ce produit chez l'hôte sous l'influence notamment du système immunitaire (Ricard et al., 1996). L'importance physiopathologique des kystes est majeure car ils constituent un réservoir à long terme au rôle crucial dans la transmission inter-hôtes, mais également parce que la conversion du stade prolifératif tachyzoïte vers le stade bradyzoïte est réversible et qu'une immunodépression peut donc entraîner une réactivation potentiellement sévère chez les sujets chroniquement infectés.

Des modifications notables accompagnent la conversion du tachyzoïte au bradyzoïte. Le profil d'expression des gènes est significativement altéré pour permettre la transition vers la quiescence et un métabolisme différent, et la vacuole parasitophore se transforme en paroi de kyste. Les chapitres ci-dessous visent à expliciter ces bouleversements qui s'opèrent au cours de la kystogénèse (**Figure 10**).

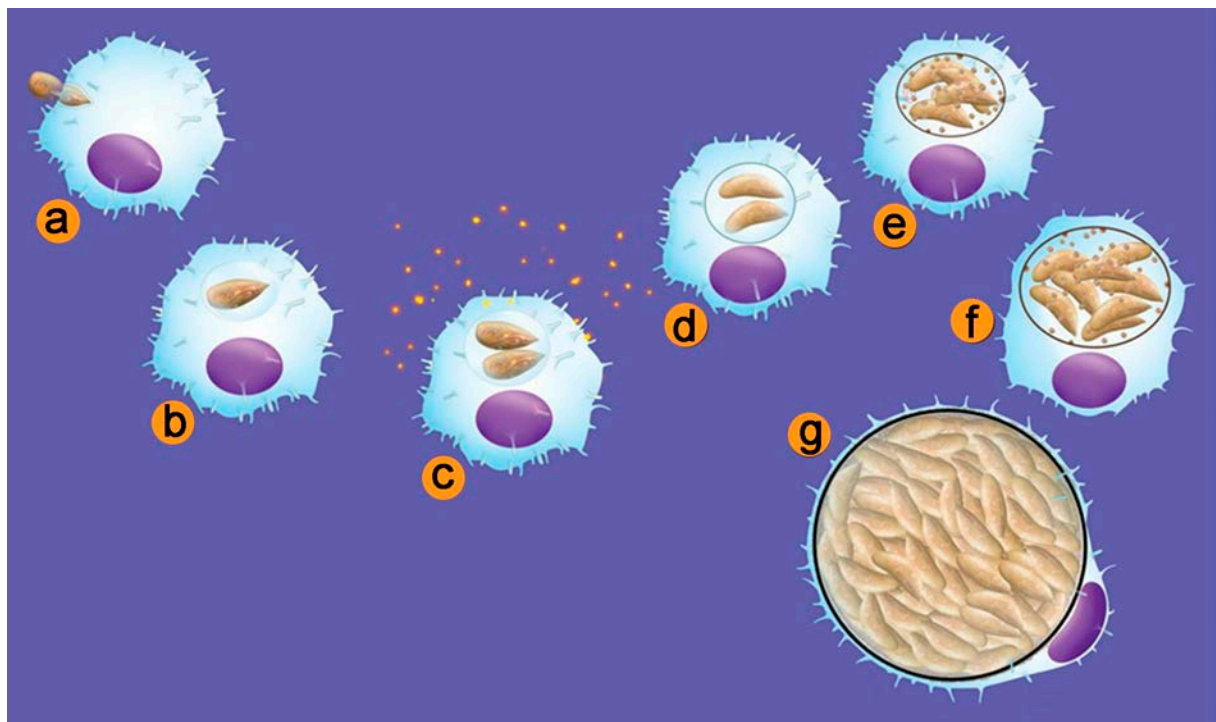


Figure 10. Vue d'ensemble de la kystogénèse.

Après l'invasion de la cellule hôte par un tachyzoïte (a) et la formation de la vacuole parasitophore autour de celui-ci (b), le parasite se multiplie par endodyogénèse (c). À l'initiation de la différenciation, les tachyzoïtes se convertissent en bradyzoïtes (d) et la membrane de la vacuole parasitophore se change progressivement en paroi kystique, à la faveur notamment des molécules sécrétées par les bradyzoïtes au sein du kyste (e-f). Les bradyzoïtes se multiplient lentement et majoritairement de manière asynchrone par endodyogénèse (e-f). D'après (Attias et al., 2020).

1. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA DIFFERENCIATION

Les connaissances concernant la différenciation du tachyzoïte en bradyzoïte ont connu une progression fulgurante ces dernières années. Même si la séquence exacte des évènements n'est pas complètement clarifiée, de récentes découvertes ont amélioré la compréhension de ce phénomène longtemps resté un mystère.

1. SUR LES TRACES DES APETALA

La conversion entre les différents stades parasitaires est associée à une bascule de l'expression des gènes de *T. gondii* entre les gènes spécifiques du tachyzoïte, et ceux spécifiques du bradyzoïte. Dans la course à l'identification des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la régulation de l'expression des gènes au cours de la différenciation, l'attention s'est initialement portée sur des facteurs de transcription portant un domaine Apetala (AP2) de liaison à l'ADN communément retrouvé chez les plantes et identifié chez les Apicomplexes en 2005 (Balaji et al., 2005). L'intérêt pour les protéines Apicomplexes portant un ou plusieurs domaines AP2 (ApiAP2) a été confirmé par l'implication de différentes ApiAP2 dans les modulations d'expression génique associés à la différenciation chez *Plasmodium* (Jeninga et al., 2019). Chez *T. gondii*, 68 ApiAP2 ont été identifiées (Farhat & Hakimi, 2022). L'implication de certaines d'entre elles dans la conversion tachyzoïte / bradyzoïte a été rapportée et est résumée dans le **Tableau 1**. Mais bien que les ApiAP2 soient impliquées dans le processus de différenciation, elles semblent n'avoir qu'un rôle secondaire, et aucune AP2 n'a été identifiée à ce jour comme étant à l'initiative de la différenciation.

Tableau 1. ApiAP2 impliquées dans la différenciation chez *T. gondii*.

ApiAP2	Nom	Rôle dans la différenciation	Référence
TGME49_306620	AP2IX-9	Répresseur	(Hong et al., 2017; J. B. Radke et al., 2013)
TGME49_318610	AP2IV-3	Activateur	(Hong et al., 2017)
TGME49_315760	AP2XI-4	Délétion : → Augmente l'expression de gènes bradyzoïtes en condition de stress → Diminue la formation de kystes <i>in vitro</i>	(Walker et al., 2013)
TGME49_288950	AP2IX-4	Activateur	(Huang et al., 2017)
TGME49_217700	AP2XII-2	- Ralentissement de la croissance des tachyzoïtes (retard de progression de la phase S) - Répresseur de différenciation <i>in vitro</i>	(Srivastava et al., 2020)
TGME49_318470	AP2IV-4	Délétion : → Expression de gènes bradyzoïtes par les tachyzoïtes → Préviend la formation de kystes en modèle murin	(J. B. Radke et al., 2018)

2. BFD1, COUPABLE IDEAL

En 2020, la découverte de la protéine BFD1 (*Bradyzoite Formation Deficient 1*) a apporté une nouvelle dimension à la régulation du processus de différenciation tachyzoïte / bradyzoïte (Waldman et al., 2020). BFD1 a été identifié grâce à un criblage du génome à l'aide d'une librairie d'ARN guides CRISPR/Cas9 visant à rechercher les

mutants incapables de se différencier sous l'effet d'un stress pH alcalin. La protéine porte un domaine de liaison à l'ADN homologue au domaine c-Myb, et est nécessaire à la différenciation *in vitro* et *in vivo*. Les parasites portant un gène BFD1 inactivé sont ainsi incapables de former des kystes chez la souris. L'étude montre également que BFD1 se fixe à proximité du site d'initiation de la transcription de plusieurs gènes régulés au cours de la différenciation, et que son expression conditionnelle permet l'induction de la différenciation même en l'absence de stress (Waldman et al., 2020). La protéine BFD1 est régulée post-transcriptionnellement avec une expression constitutive de son ARNm aux stades tachyzoïte et bradyzoïte, mais une expression exclusive de la protéine dans les bradyzoïtes convertis *in vitro*. Cependant, il existe une corrélation faible entre les adresses chromosomiques de la protéine BFD1 déterminées par CUT & RUN (*Cleavage Under Target & Release Using Nuclease*) et les gènes régulés au niveau transcriptionnel par l'expression de BFD1, suggérant d'autres mécanismes en jeu (Farhat & Hakimi, 2022). C'est dans ce contexte que la protéine codée par le gène TGME49_311100 nommé BFD2 ou ROCY1 (Regulator of Cystogenesis) a été identifiée (Borrelli et al., 2022; Licon et al., s. d.). BFD2/ROCY1 serait nécessaire à la formation des kystes par une action de rétrocontrôle positif de la fonction de BFD1. En effet, les parasites délétés pour BFD2/ROCY1 ne parviennent pas à induire BFD1 et donc à se différencier *in vitro* ou *in vivo* (Licon et al., s. d.). Étonnamment, alors qu'aucun kyste n'était détecté dans le cerveau de souris infectées par une souche délétée pour BFD2/ROCY1, l'infection a pu être réactivée après immunosuppression (Borrelli et al., 2022).

3. MORC, HDAC3 ET LA PISTE EPIGENETIQUE

L'hypothèse de travail formulée très tôt par notre équipe est que la pénurie de facteurs de transcription spécifiques chez *T. gondii* a été compensée au cours de l'évolution par une diversification plus grande des machineries de remodelage physique et chimique de la chromatine, à même de répondre au cycle de vie particulier de ces parasites intracellulaires (Sullivan Jr. & Hakimi, 2006). Le remodelage nucléosomal est connu pour avoir un impact drastique sur la régulation de la transcription des gènes eucaryotes et est qualifié à ce titre comme un mécanisme épigénétique.

L'épigénétique se définit comme l'ensemble des altérations de l'expression d'un gène transmissibles au cours du cycle cellulaire aux cellules filles et n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN. L'un des principaux mécanismes de régulation épigénétique implique une modification de la structure de la chromatine, structure au sein de laquelle l'ADN se trouve compacté. L'unité de base de ce compactage du

matériel génétique est le nucléosome, constitué d'un enroulement d'ADN d'environ 147 pb autour d'un octamère protéique composé de 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 – il est à noter que *T. gondii* possède également 5 variants, à savoir H3.3, CenH3, H2A.Z, H2A.X et H2B.Z (K. Kim, 2018) (**Figure 11. A**). La modification de la structure de la chromatine, du fait de modifications post-traductionnelles des histones (PTMs) ou de méthylations directes de l'ADN, entraîne des modifications de l'accessibilité des gènes aux complexes transcriptionnels et aux polymérases. L'euchromatine correspond à la chromatine lâche, dans laquelle l'ADN est accessible et où la transcription est active, et l'hétérochromatine, à la chromatine condensée au sein de laquelle les gènes sont inaccessibles, et la transcription réprimée (Narlikar et al., 2002). La méthylation de l'ADN n'a pas été observée chez les Apicomplexes, et c'est donc principalement sur les combinaisons de PTMs communément appelé le code histone, que repose la régulation de l'état de la chromatine (K. Kim, 2018). Parmi des dizaines de PTMs relevées, l'acétylation, la méthylation, et la phosphorylation dominent et affectent principalement la queue des histones exposée à l'extérieur du nucléosome (Nardelli et al., 2013), mais également la partie globulaire (Sindikubwabo et al., 2017).

L'acétylation des histones est une PTM largement étudiée. Il s'agit de l'adjonction d'un groupement acétyle généralement au niveau d'un résidu Lysine (K), qui atténue la charge positive des histones et donc leur liaison avec l'ADN chargé négativement, et contribue ainsi à maintenir la chromatine ouverte. L'acétylation des histones est catalysée par les histones acétyltransférases (HAT) également nommées lysine acétyltransférases (KAT), tandis que la réaction opposée de désacétylation est exécutée par les Histones Désacétylases (HDAC) (**Figure 11. B**).

Les KATs agissent sur une diversité remarquable de substrats et démontrent un haut degré de spécificité pour les résidus sur lesquels elles agissent. Chez *T. gondii*, on retrouve les trois grandes familles de KATs : GNAT (GCN5a, GCN5b, Elp3 et Hat1), MYST (MYSTa et MYSTb) et les HATs reliées aux facteurs de transcription (TAF1/250) (Sullivan Jr. & Hakimi, 2006). GCN5-A y régule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des bradyzoïtes mais reste non essentielle à la prolifération des zoïtes dans des conditions de culture normales (Naguleswaran et al., 2010), à l'inverse de GCN5-B, qui est essentielle et forme un complexe avec des protéines ApiAP2 (Harris et al., 2019; J. Wang et al., 2014).

L'importance fonctionnelle de l'acétylation dépend complètement de la précision et de l'efficacité d'une part de l'acétylation mais aussi de sa réaction opposée : la désacétylation réalisée par les histones désacétylases (HDAC). Pour ce qui est des

HDAC, au total 18 HDACs ont été identifiées chez les eucaryotes et sont regroupées en quatre classes en fonction de leur similarité. Chez *T. gondii*, sept HDACs sont prédites parmi lesquelles cinq HDAC de classe I/II (TgHDAC1-5) et deux homologues du sous-type Sir2 (classe III) (Hailu et al., 2017). À l'exception de HDAC3, HDAC de classe I/II située dans le compartiment nucléaire, le rôle des HDACs de *T. gondii* est encore obscur. Notre équipe a montré le rôle central de HDAC3 dans l'expression génique et la conversion de stade chez *T. gondii* de concert avec GCN5b (Bougdour et al., 2009; Saksouk et al., 2005). L'inhibition spécifique de TgHDAC3 par le cyclopeptide FR235222 perturbe le niveau d'acétylation de l'histone H4 dans l'ensemble du génome, induisant la dérégulation de gènes spécifiques de stades parasitaires autres que tachyzoïte, et notamment de gènes spécifiques du stade bradyzoïte (Bougdour et al., 2009). Plus récemment, la protéine *T. gondii* microrchidia (MORC) a été identifiée comme étant à l'initiative de cette répression dirigée de HDAC3 sur les gènes spécifiques de stades (Farhat et al., 2020).

La protéine MORC étant essentielle, l'étude des effets de sa déplétion a pu être réalisée à l'aide d'une construction à partir du système mAID pour induire un knockdown inductible de la protéine à l'ajout d'auxine (**Figure 12. A**). Notre équipe a ainsi pu montrer que cette ATPase très conservée recrutait HDAC3 à la chromatine, en partenariat avec des ApiAP2, au niveau des gènes spécifiques de stades autres que tachyzoïte. La déplétion de MORC induit l'expression d'environ 50% des gènes bradyzoïtes, 84% des gènes de stades sexués et près de 90% des gènes du stade sporozoïte (Farhat et al., 2020) (**Figure 12. B**). MORC se comporte ainsi comme un commutateur transcriptionnel au carrefour des différents stades parasite de *T. gondii*.

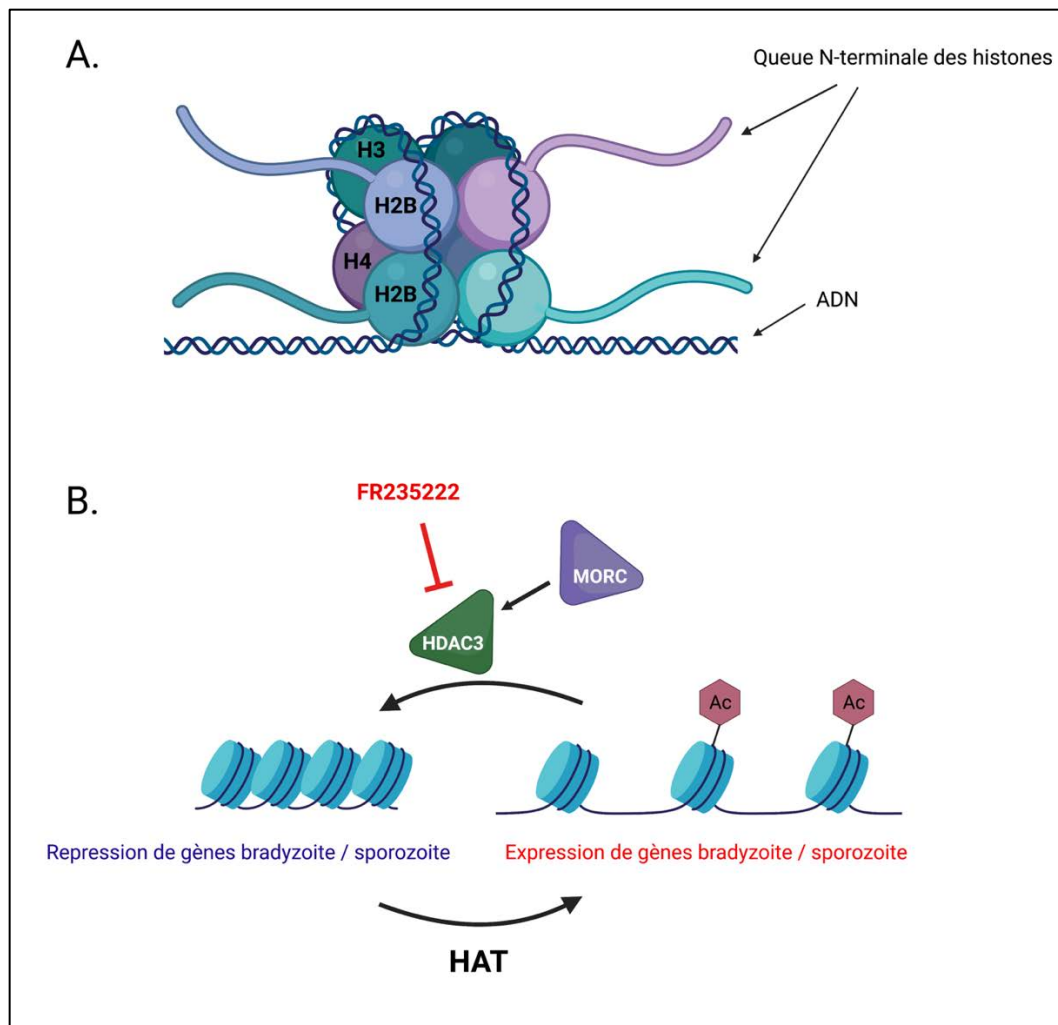


Figure 11. Modifications post-traductionnelles des histones.

A) Représentation schématique d'un nucléosome, constitué d'un enroulement d'ADN d'environ 147 pb autour d'un octamère protéique composé des histones H2A, H2B, H3 et H4. B) L'acétylation des histones est catalysée par les histones acétyltransférases (HAT). Cette opération induit un relâchement de la chromatine favorisant l'expression des gènes. À l'inverse, la désacétylation exécutée par HDAC3 recrutée par MORC, et peut être inhibée par le composé FR235222. Réalisé avec Biorender.

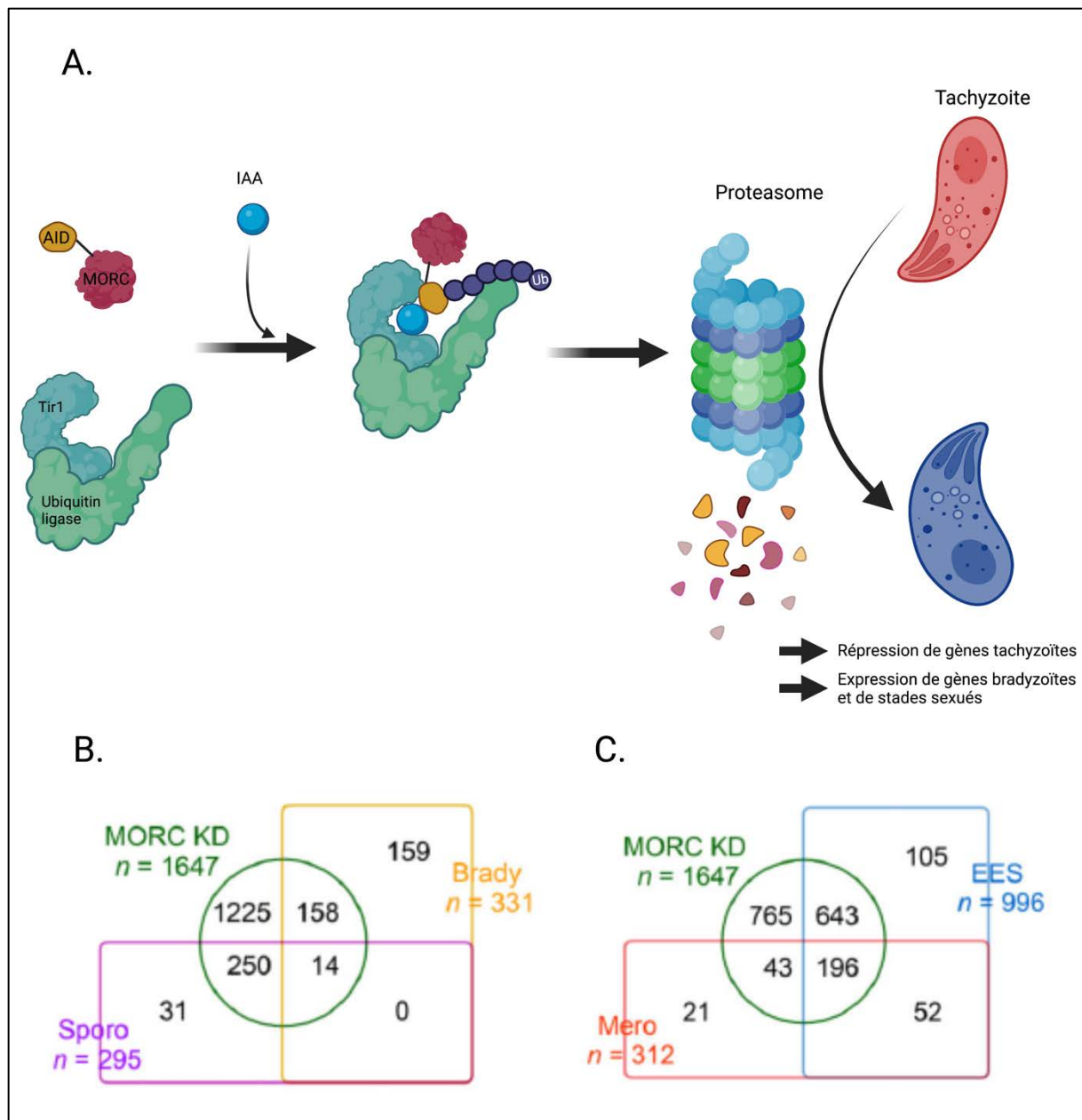


Figure 12. Knockdown inducible de la protéine MORC à l'aide du système mAID.

A) Système de knockdown inducible de MORC. La protéine MORC a été marquée avec le motif mAID dans des souches parasitaires exprimant TIR1 de manière ectopique et sous le contrôle du promoteur UPRT. Réalisé avec Biorender. B et C) Diagrammes de Venn illustrant le chevauchement entre les gènes régulés par MORC ($n = 1647$) et les gènes exprimés en fonction du stade parasitaire de *T. gondii*. D'après Farhat et al., 2020 (Farhat et al., 2020).

2. PAROI KYSTIQUE

La paroi du kyste constitue une barrière de protection permettant d'assurer sa résistance et sa protection vis-à-vis des facteurs immunitaires de l'hôte (Knoll et al., 2014). Elle dérive de la vacuole parasitophore dans laquelle se multiplient les tachyzoïtes, et commence à se développer sous cette membrane dès l'enclenchement

de la différenciation. Il s'agit d'une structure compacte d'aspect rugueux et irrégulier et formée d'une couche compacte à la partie externe du kyste, et d'une couche spongieuse du côté de la matrice du kyste (Lemgruber et al., 2011). Les détails de sa composition et de sa genèse sont mal connus. Elle contient de la chitine et divers protéines glycosylées. La glycosylation s'avère jouer un rôle dans la protection et la stabilité des kystes, mais elle permet également la détection de la paroi kystique par différentes lectines comme la *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) reconnaissant la N-acétyl galactosamine (Boothroyd et al., 1997), ce qui peut être utilisé en expérimentation. La protéine CST1 est une de des protéines glycosylées de la paroi kystique (Zhang et al., 2001). Il s'agit d'une protéine de 250 kDa possédant un domaine apparenté à SAG1 (on parle de SRS pour *SAG1 related sequence*) et un domaine *mucin-like* nécessaire à sa glycosylation. La délétion de CST1 entraîne la formation de kystes moins nombreux et plus fragiles, ce qui montre l'importance structurale de cette protéine et de sa glycosylation (Tomita et al., 2013).

Plusieurs protéines GRA ont été identifiées au sein de la paroi kystique, et sont pour la plupart, également présentes au niveau de la PVM des tachyzoïtes (Jeffers et al., 2018). Les autres protéines classiquement retrouvées au niveau de la paroi du kyste sont BPK1 (bradyzoite pseudokinase 1), impliquée dans la résistance à l'acidité, MCP4 (Microneme-Adhesive-Repeat domain containing protein 4) ou encore PPG1 (protéophosphoglycane 1) (Jeffers et al., 2018; Tu et al., 2018). La protéine MAG1 (Matrix antigen 1), également détectée au sein de la matrice des tachyzoïtes, est surexprimée au stade bradyzoïte et détectée dans la paroi et la matrice du kyste (Ferguson & Parmley, 2002, p. 1). Une récente analyse protéomique des fragments de paroi kystique immunoprécipités avec un anticorps anti-CST1 a mis en évidence de nouvelles protéines issues des granules denses et associées à la paroi kystique dont CST2/GRA47 et CST3/GRA48, ainsi que plusieurs autres protéines hypothétiques non encore caractérisées (Tu et al., 2019).

Parmi celles-ci se trouve la protéine BCLA (Brain Cyst Load-associated Antigen, *TGME49_209755*) récemment mise en évidence par notre équipe (Dard et al., 2021). Cette protéine d'environ 140 kDa est composée en son centre de 13 répétitions d'un motif de 48 acides aminés, et d'une région C-terminale conservée et ordonnée (**Figure 13. A**). Elle est sécrétée au sein de la vacuole parasitaire et s'accumule à la périphérie du kyste où elle joue un rôle dans le maintien de la structure de la paroi (**Figure 13. B**). En effet, la délétion de BCLA conduit à la formation de kystes plus petits et présentant des anomalies de forme, mais sans perte de résistance mécanique ou d'infectiosité (Dard et al., 2021). BCLA s'avère être immunogène, et du fait de son

expression spécifique au stade chronique, elle constitue un marqueur sérologique de la présence de kystes de *T. gondii*. Un test sérologique ELISA composé des deux peptides les plus reconnus et de la région C-terminale de la protéine exprimée en *E. coli* a été développé pour détecter les IgG anti-BCLA et a permis d'identifier le portage de kystes chez la souris. En effet, les souris chroniquement infectées par des souches aptes à produire des kystes *in vivo* présentaient une sérologie positive, à la différence des souris naïves, en phase aiguë d'infection ou chroniquement infectées par des souches de laboratoire peu voire pas kystogéniques (CTG, RH, PruΔKu80). Les résultats de la sérologie BCLA en phase chronique en modèle murin étaient corrélés à la charge parasitaire cérébrale mesurée par qPCR, ainsi qu'à l'expression des marqueurs miR-155 et miR-146a (**Figure 13. C**). Chez l'humain, la sérologie BCLA présentait des taux significativement plus élevés dans le groupe des patients identifiés comme chroniquement infectés par des tests sérologiques classiques, par rapport au groupe de patients séronégatifs (**Figure 13. D**) (Dard et al., 2021).

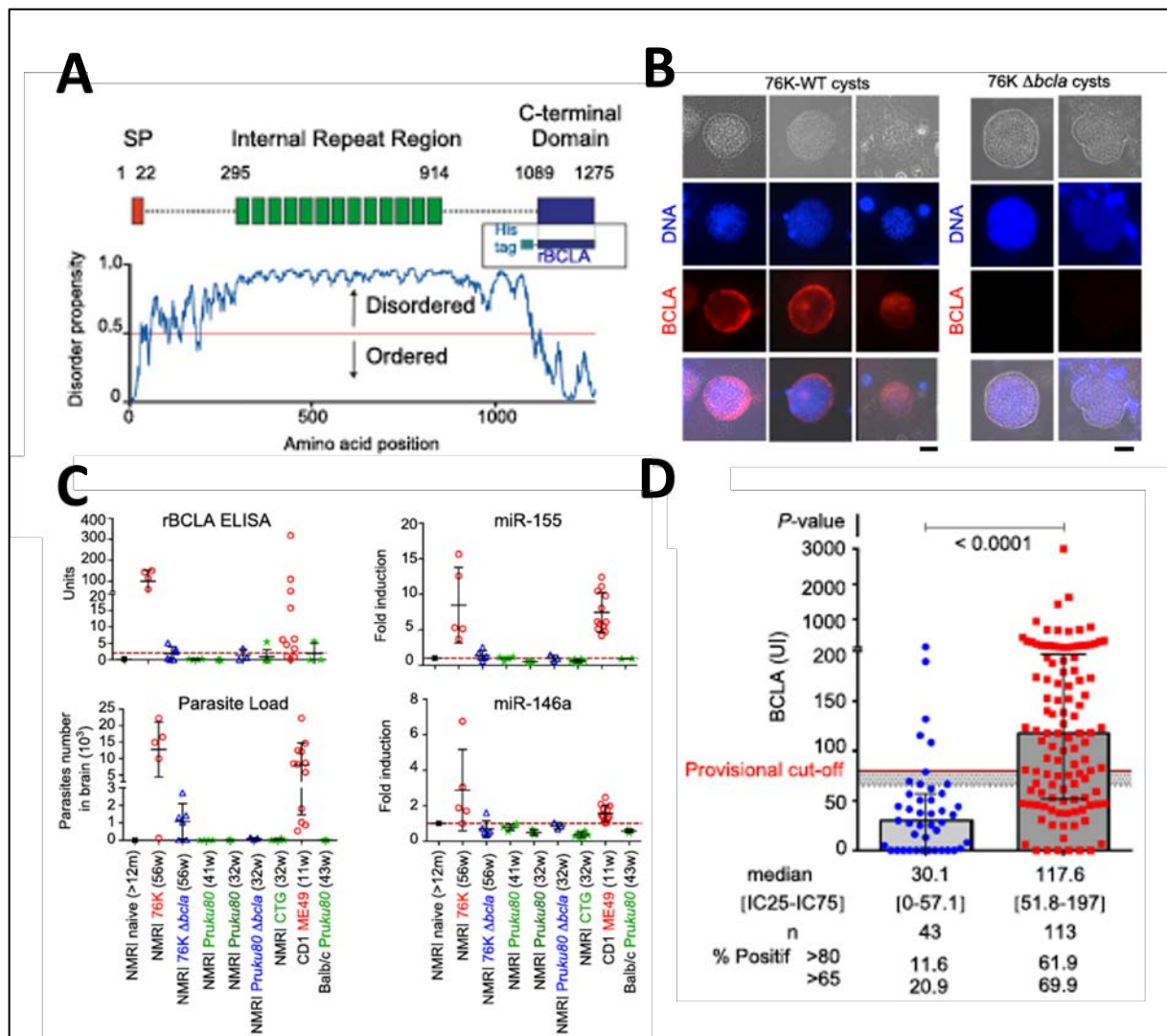


Figure 13. BCLA, protéine immunogène de la paroi kystique.

A. Représentation de la protéine BCLA, désordonnée sur l'ensemble de ses séquences répétées et comportant un domaine C-terminal ordonné d'environ 150 kDa. B. Immunofluorescence sur kystes ex-vivo. BCLA est localisée à la périphérie du kyste. La délétion de BCLA induit la modification de la structure du kyste. C. La sérologie BCLA est corrélée à la charge parasitaire et à l'expression de miR-155 et miR-146a dans le cerveau de souris naïves ou chroniquement infectées par des souches kystogéniques (en rouge), peu ou pas kystogéniques (en vert) ou délétées pour *bcla* (en bleu). D. Sérologie BCLA chez des patients identifiés comme séronégatifs (en bleu) ou chroniquement infectés (en rouge) par *T. gondii* par les tests sérologiques classiques. D'après Dard et al., 2021 (Dard et al., 2021).

3. SPECIFICITE DES KYSTES ET DES BRADYZOÏTES

1. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET LOCALISATION

a) Morphologie

La taille des kystes tissulaires est variable en fonction de leur âge, du type de cellule hôte mais également de la souche de *T. gondii*. Ils mesurent de 5 à 100 μm et

contiennent entre 2 et plusieurs centaines de bradyzoïtes. Leur forme varie également selon le type cellulaire : les kystes observés au niveau cérébral sont généralement sphériques et mesurent 50 à 70 μm , alors que les kystes intramusculaires sont allongés et peuvent atteindre 100 μm de long (Dubey et al., 1998). Leur paroi est élastique et mesure environ 250 nm d'épaisseur. À l'intérieur, les bradyzoïtes se divisent par endodyogénie, à l'instar des tachyzoïtes, mais ne sont pas organisés en rosette comme dans la vacuole parasitophore du stade aiguë (**Figure 14**).

Comme précédemment explicité, les tachyzoïtes et les bradyzoïtes diffèrent relativement peu sur le plan morphologique. Les différences structurelles résident dans (i) la forme plus affinée et plus arquée du bradyzoïte, (ii) la localisation postérieure du noyau (vs localisation centrale chez le tachyzoïte), (iii) des micronèmes plus nombreux, (iv) des rhoptries qui font des boucles sur elles-mêmes, et au contenu dense aux électrons lorsque les bradyzoïtes sont matures, (v) la présence de nombreuses granules d'amylopectine (Knoll et al., 2014) (**Figure 3**).

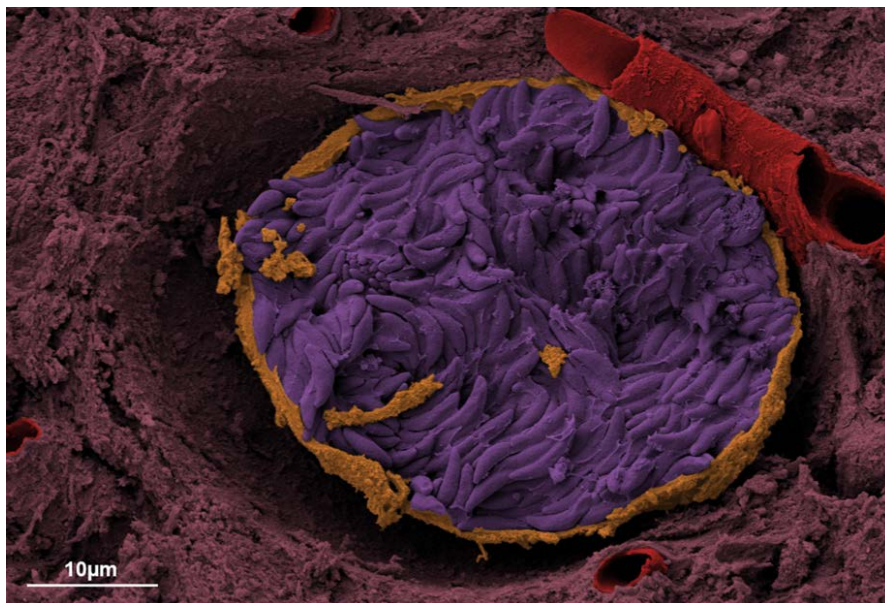


Figure 14. Modèle 3D d'une coupe de kyste cérébral en modèle murin obtenu à partir d'images de microscopie électronique.

Bradyzoïtes (en violet) entourés par la paroi kystique (en jaune). D'après Attias et al., 2020 (Attias et al., 2020).

b) Localisation

Bien que les kystes puissent se développer dans différents organes chez les hôtes intermédiaires (foie, reins, poumons...), ils sont plus fréquents au niveau cérébral, oculaire et musculaire (notamment au niveau du muscle cardiaque) (Dubey et al., 1998). Deux hypothèses co-existent pour expliquer cette localisation préférentielle : la théorie selon laquelle des kystes se formeraient indifféremment dans tout

l'organisme mais ne se maintiendraient que dans les sites de privilège immunitaire, et celle qui veut que la différenciation des bradyzoïtes et la formation de kystes tissulaires soit principalement déclenchées dans les neurones et les cellules musculaires (Lüder & Rahman, 2017).

Les cellules très différenciées et à durée de vie longue comme les neurones ou les cellules musculaires paraissent parfaitement adaptées à l'installation du stade chronique de *T. gondii*, et certaines données suggèrent que le type et l'état cellulaire conditionnent la propension du parasite à la différenciation. En effet, certains types cellulaires comme les neurones et les cellules musculaires sont plus propices à la formation spontanée de kystes en l'absence de stress *in vitro* (Ferreira-da-Silva et al., 2009, 2009). D'autre part ce ne serait pas tant à la nature de la cellule, mais plutôt à l'arrêt du cycle cellulaire que tiendrait cette compétence : alors que la culture sur cellules musculaires lisses de souris favorise la différenciation *in vitro*, ce n'est pas le cas sur myoblastes en prolifération (Swierzy & Lüder, 2015). Aussi, bien que *in vitro* *T. gondii* soit capable d'infecter aussi bien les astrocytes, les cellules microgliales et les neurones, une récente étude en modèle murin prouve que dans le SNC *in vivo*, les neurones constituent la cible principale du parasite (Cabral et al., 2016). L'infection de souris qui expriment la GFP sous la dépendance de la recombinaison Cre par une souche de *T. gondii* qui injectent cette dernière dans ses cellules hôtes, a ainsi permis de montrer que le parasite interagissait préférentiellement avec les neurones (Cabral et al., 2016).

2. *PHYSIOLOGIE*

a) **Dynamique**

La différenciation du tachyzoïte en bradyzoïte est concomitante d'un ralentissement du cycle cellulaire (J. R. Radke et al., 2003). Aussi, le kyste et son contenu de bradyzoïte a longtemps été considéré comme une entité homogène et dormante. Une étude récente a cependant fait émerger l'image d'une infection chronique bien plus dynamique que prévu. En 2015, Watts et al. ont en effet développé une solution numérique permettant de compter les bradyzoïtes à l'intérieur des kystes (Watts et al., 2015). Ils ont ainsi découvert que bien qu'en général les kystes tissulaires plus grands contiennent plus de bradyzoïtes, leur densité relative ou « densité d'occupation » en parasite est plus faible : ils contiennent en fait proportionnellement moins de parasites et plus de matrice interstitielle. Aussi les kystes sont-ils des entités dynamiques, présentant un schéma général d'expansion pendant la phase chronique. Pour savoir si cette expansion était due à la réplication des bradyzoïtes, ils ont utilisé

un marquage dirigé contre la protéine IMC3 du complexe membranaire interne, plus abondante chez les parasites fraîchement répliqués. Ils ont ainsi pu observer non seulement des répliquations sporadiques mais aussi des phénomènes plus groupés voire synchronisés, que l'on pensait auparavant l'apanage du tachyzoïte (Watts et al., 2015).

D'autre part, l'infection chronique par *T. gondii* induit de subtiles variations chez l'hôte. Il a ainsi été démontré que l'infection – d'autant plus en phase chronique - altérerait le profil d'expression des microARNs (miARN) au niveau cérébral. Des profils distincts sont observés au cours de l'infection aiguë et de l'infection chronique (Hu et al., 2018). Les miARN sont de courtes séquences simple brin d'ARN d'une vingtaine de nucléotides, qui peuvent affecter directement l'expression de milliers de gènes en réprimant la traduction ou en induisant la dégradation d'ARNm cibles. Les interférences du parasite dans le profil d'expression des miARN de la cellule infectée peuvent lui permettre de remodeler l'environnement cellulaire ou la réponse immunitaire de l'hôte à son profit (M. Hakimi & Cannella, 2011). Notre équipe a ainsi montré que l'expression de 2 miARNs immunorégulateurs, miR-146a et miR-155, était augmentée dans le cerveau de souris chroniquement infectées par des souches kystogéniques (de type 2) ; les niveaux d'expression de miR-155 et miR-146a sont corrélés à la charge kystique cérébrale (Cannella et al., 2014).

b) Métabolisme

La chaîne respiratoire mitochondriale et le cycle de Krebs n'étant pas fonctionnel chez les bradyzoïtes, leur production énergétique repose sur la glycolyse anaérobie (Denton et al., 1996). Le bon fonctionnement de ce métabolisme particulier s'appuie sur l'expression d'isoformes enzymatiques différentes de celles utilisées pour le métabolisme du tachyzoïte. Ainsi, l'enolase 2 (ENO2) chez le tachyzoïte est 3 fois plus active que l'ENO1 retrouvée chez le bradyzoïte, et à l'inverse, c'est la lactate déshydrogénase 2 (LDH2) qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate chez le bradyzoïte alors que la LDH1 est exprimée chez le tachyzoïte (Knoll et al., 2014). Une récente étude a montré que de façon assez paradoxale, bien que la LDH1 ne soit pas exprimée au stade bradyzoïte, sa délétion a des répercussions non seulement sur la virulence du tachyzoïte mais également sur la différenciation *in vitro* et sur la quantité de kystes *in vivo*, alors que la délétion de LDH2, si elle réduit la charge des kystes *in vivo*, n'affecte pas la différenciation des bradyzoïtes (Abdelbaset et al., 2017). D'autre part, les granules d'amylopectines retrouvées en quantité importante chez les bradyzoïtes constituent les réserves de polysaccharides du parasite au cours de la période de latence (Knoll et al., 2014). Une parfaite régulation du métabolisme de

l'amylopectine est nécessaire à la persistance des bradyzoïtes *in vivo* (Sugi et al., 2017; Uboldi et al., 2015).

c) Contrôle par le système immunitaire

Le kyste a longtemps été considéré comme « immunologiquement silencieux » et capable d'échapper complètement au système immunitaire de l'hôte. Du point de vue de la réponse humorale notamment, une étude de 1995 rapportait la présence d'anticorps dirigés essentiellement contre les antigènes de tachyzoïtes et de façon marginale seulement vers les kystes, dans 30 sérums de patients séropositifs pour *Toxoplasma* (Zhang et al., 1995). Cependant, les travaux de l'équipe concernant BCLA démontrent l'existence d'une réponse humorale dirigée contre un antigène spécifique du bradyzoïte (Dard et al., 2021). D'autre part, la présence dans le système nerveux central infecté, d'une population de macrophage activés par la chitine de la paroi kystique et capables de lyser les kystes via la production d'une chitinase (Nance et al., 2012), démontre également que les kystes ne sont pas totalement invisibles par le système immunitaire. Enfin, Suzuki et al. ont montré que des LT CD8⁺ activés transférés à des souris immunodéprimées infectées par *T. gondii* pouvaient éliminer les kystes du cerveau de ces dernières par une activité cytotoxique médiée par la perforine (Suzuki et al., 2010).

Cependant, certaines données d'imagerie en modèle murin indiquent que les LT CD8⁺ essentiels au contrôle de l'infection chronique par *T. gondii* n'interagissent pas avec des kystes ou des neurones infectés par des kystes (Schaeffer et al., 2009). Plus récemment, une étude a montré que la présentation par le CMH-I de neurones infectés, d'antigènes qu'ils soient exprimés ou non dans le bradyzoïte, permettait de contrôler efficacement l'infection dans le SNC (Salvioni et al., 2019). Cela suggère que les LT CD8⁺ répondent principalement à des cellules infectées par des tachyzoïtes, ce qui peut expliquer la persistance du parasite sous sa forme kystique, qui échappe ainsi à certains mécanismes de défense de l'hôte.

3. PROFIL PROTEIQUE ET MARQUEURS DE BRADYZOÏTES

Les différences phénotypiques observées au cours de la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte sont associées à un changement de profil protéique (Fritz et al., 2012; J. R. Radke et al., 2005). La comparaison de l'expression protéique de *T. gondii* chez la souris en phase aiguë et chronique de l'infection a ainsi révélé qu'environ 547 gènes étaient significativement exprimés de façon différentielle entre les deux stades (Pittman et al., 2014). Plus récemment, la comparaison des profils protéiques obtenus en fonction de l'expression de BFD1 a permis d'identifier 585 gènes surexprimés et

655 gènes sous-exprimés dans les bradyzoïtes induits par expression de BFD1 par rapport aux tachyzoïtes. La plupart de ces gènes exprimés de façon différentielle avait déjà été précédemment identifié *via* des études sur bradyzoïtes induits par stress alcalin (Waldman et al., 2020).

Ainsi, plusieurs de ces protéines spécifiques de stade sont utilisées comme marqueurs de tachyzoïte, de bradyzoïte ou de kyste tissulaire (**Figure 15**). C'est le cas des enzymes métaboliques citées ci-dessus, LDH1 et ENO2 en tant que marqueurs du tachyzoïte, et LDH2 et ENO1 comme marqueurs du bradyzoïte, ou encore de la protéine CST1 au niveau de la paroi kystique. Si certaines protéines de surface peuvent être retrouvées au cours des deux stades parasitaires, d'autres comme SAG1 (Surface antigen 1) sont d'excellents marqueurs du tachyzoïte. Exprimée exclusivement dans celui-ci, cette protéine impliquée dans le processus d'invasion de la cellule hôte se trouve être également l'une des plus immunogènes du tachyzoïte (Y. Wang & Yin, 2014, p. 1). À l'inverse, les antigènes de surface BSR4 et SAG4 sont restreints au bradyzoïte.

BAG1/HSP30 (Bradyzoite antigen 1/Heat shock protein 30) est historiquement l'un des marqueurs du bradyzoïte les plus utilisés du fait entre autre de son abondance dans le cytoplasme de ce stade parasitaire (Tu et al., 2018).

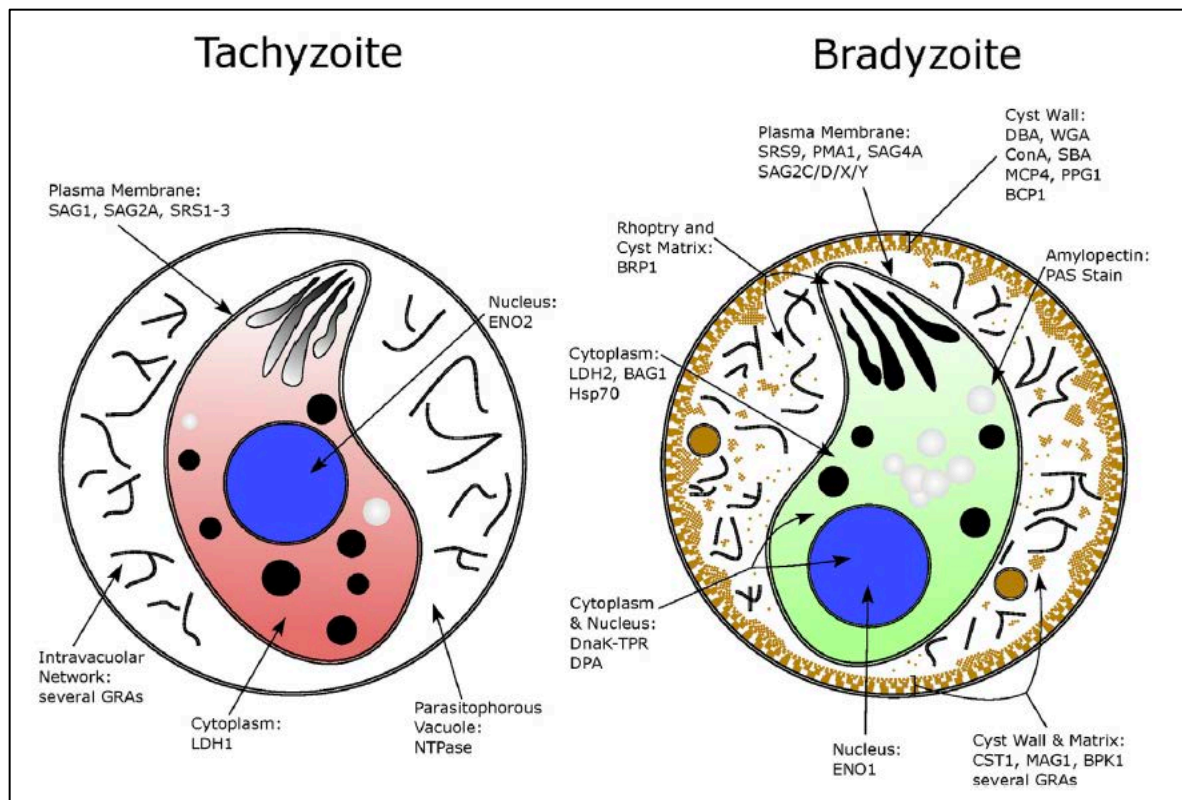


Figure 15. Principaux marqueurs des stades bradyzoïtes et tachyzoïtes et leur localisation.

D'après Tu et al., 2018 (Tu et al., 2018).

III. TOXOPLASMOSE HUMAINE

1. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

1. SEROPREVALENCE

La distribution mondiale de l'infection par *T. gondii* est également vérifiée chez l'humain. Les données de séroprévalences les plus abondantes concernent la population des femmes enceintes, et elles font état d'une séroprévalence mondiale autour de 30%, avec de grandes disparités géographiques (**Figure 16**) (Bigna et al., 2020; Rostami et al., 2020). Les régions à plus forte prévalence sont l'Amérique du Sud avec un taux à 56,2%, suivie de l'Afrique (48,7%), et la prévalence la plus faible est retrouvée dans la région du Pacifique occidental (11,8%). En Europe, la prévalence serait de 31,2% (Rostami et al., 2020). De manière générale, une prévalence plus élevée est observée dans les pays à faible revenu.

En France, selon une étude réalisée entre 1995 et 2016, la séroprévalence chez les femmes enceintes est en diminution. Elle atteignait en effet 54% en 1995, et était à 31,3% en 2016 (Robinson et al., 2021). Selon une estimation basée sur des

modélisations, elle était à 27% en 2020 (Nogareda et al., 2014). La séroprévalence varie significativement en fonction de différents paramètres :

- L'âge : la séroprévalence est à 19,5% dans la population des femmes enceintes de 20 à 24 ans, et à 51,7% chez les femmes de 40 ans et plus.
- Le lieu de résidence : les séroprévalences sont plus élevées dans les départements et régions d'Outre-Mer, en région parisienne et dans le Sud-Ouest de la France.
- Le niveau de vie : de façon assez paradoxale par rapport à ce qui est observé à l'échelle mondiale, les ménages à plus hauts revenus et les catégories socio-professionnelles supérieures étaient associées à une séroprévalence plus importante (Robinson et al., 2021).

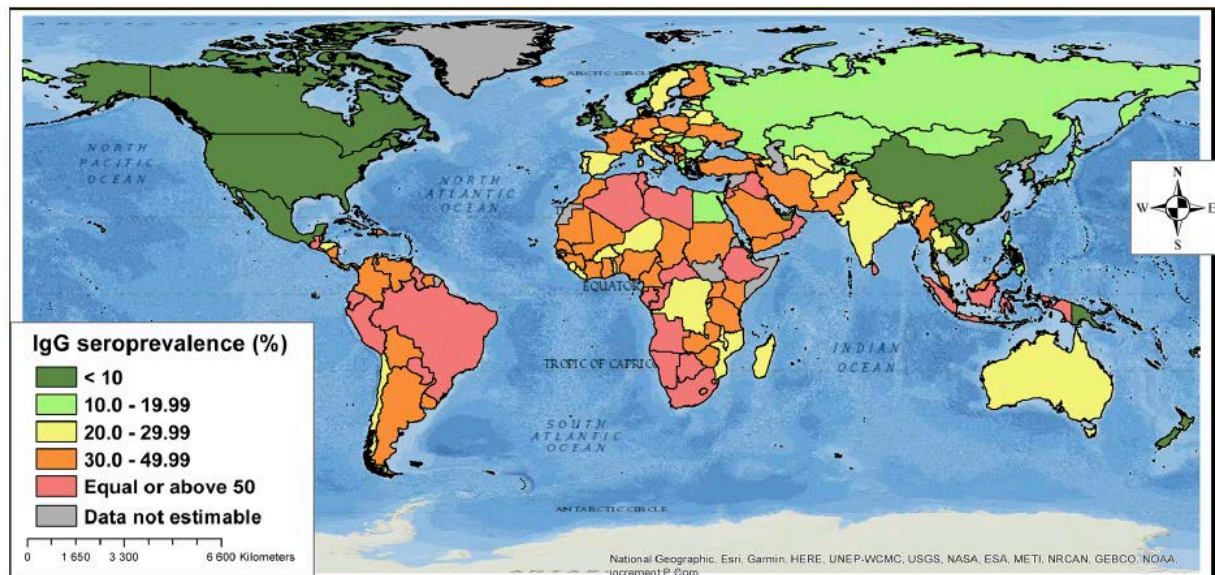


Figure 16. Distribution mondiale de la séroprévalence de l'infection par *T. gondii*.

Données obtenues par méta-analyse et modélisation à partir de 250 études publiées entre 1979 et 2018 et portant sur 723 655 femmes enceintes à travers le monde. D'après Bigna et al., 2020 (Bigna et al., 2020).

2. MODES DE CONTAMINATION

La toxoplasmose est une infection principalement d'origine alimentaire liée à l'ingestion de viande contenant des kystes, ou d'oocystes émis dans l'environnement par les félins et pouvant souiller l'eau de boisson ou les crudités. La part des contaminations par voie materno-fœtale est relativement faible et loin d'expliquer à elle seule l'infection de près d'un tiers de l'humanité (Tenter et al., 2000). De façon anecdotique, l'ingestion de tachyzoïtes contenu dans du lait non pasteurisé a pu être proposé comme origine de contaminations (Skinner et al., 1990). Selon une étude de 2014, la toxoplasmose serait la 3^{ème} infection d'origine alimentaire la plus coûteuse en

terme d'années-personnes sans invalidité (QALY, de l'anglais *quality-adjusted life year*) (Batz et al., 2014). Une analyse multi-critère de l'OMS classe la toxoplasmose au 4^{ème} rang des parasitose d'origine alimentaire au niveau mondial (Boireau et al., 2014), et une analyse similaire à l'échelle européenne positionne la toxoplasmose en 2^{ème} position (Bouwknegt et al., 2018).

Le risque d'infection par kystes tissulaires dépend du type de viande et des modalités de préparation. La séroprévalence en fonction des espèces est variable en fonction de régions et des modalités d'élevage (Stelzer et al., 2019), et pour ce qui est de l'Europe, les viandes les plus à risque sont les gibiers, viandes de moutons, de bœuf et de cheval (Kijlstra & Jongert, 2009). Les pratiques culinaires ou culturelles associées à la consommation de viandes crues ou insuffisamment cuites sont à risque.

Concernant les oocystes, les facteurs climatiques peuvent affecter la survenue et la durée de leur sporulation ainsi que la survie des oocystes sporulés dans l'environnement. Aussi, les oocystes non sporulés sont-ils sensibles à une exposition de 24h à 37°C alors que les oocystes sporulés restent viables plusieurs mois voire plusieurs années en fonction de l'humidité et de la température (Dubey, 1998; Dubey et al., 1970). La pluviométrie peut également favoriser la dissémination des oocystes (VanWormer et al., 2016).

Les variations épidémiologiques observées en fonction des régions peuvent donc être mises en relation avec différents paramètres climatiques (température, hygrométrie) ou socio-culturels (habitudes alimentaires, modes de vie...). Une étude réalisée en Chine auprès de 235 femmes enceintes a ainsi identifié la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite, de légumes ou de fruits crus non lavés, le contact avec des chats, le fait de vivre dans des zones rurales et le faible niveau d'éducation, comme des facteurs de risque d'infection par *T. gondii* (Q. Liu et al., 2009).

Alors qu'en modèle murin l'issue de l'infection semble varier en fonction du stade infectant (Dubey, 2006), il est difficile de savoir s'il existe également des différences épidémiologiques et cliniques en fonction du stade parasite infectant chez l'humain car la source de l'infection est rarement identifiée. Les seuls indices proviennent des quelques épidémies rapportées dans la littérature et qui investiguent avec assez de précisions ces données. Une revue systématique de la littérature concernant les épidémies de toxoplasmose humaine indique qu'il ne semble pas y avoir de différence en terme de présentation clinique – si ce n'est dans le délai d'incubation qui paraissait plus court après ingestion de kystes que d'oocystes -, mais que les épidémies attribuées aux oocystes affectaient plus de sujets que les épidémies liées aux kystes (Meireles et al., 2015).

2. PRESENTATIONS CLINIQUES

1. *TOXOPLASMOSE ACQUISE DE L'IMMUNOCOMPETENT*

Chez l'immunocompétent y compris la femme enceinte, l'infection n'est symptomatique que dans environ 10% des cas en Europe et en Amérique du Nord (J. Montoya & Liesenfeld, 2004). Les symptômes sont alors aspécifiques. Fièvre, adénopathies, céphalées, arthralgies, myalgies et plus rarement troubles digestifs ou éruptions cutanées sont les signes les plus couramment rapportés (Dubey, 2021).

L'infection acquise peut aussi s'accompagner de manifestations oculaires. L'étude rétrospective d'une série de cas de toxoplasmose oculaire a ainsi montré que sur 162 cas pour lesquels la nature congénitale ou acquise de l'infection a pu être identifiée, près de 62% étaient des toxoplasmose acquises (Delair et al., 2008). Les données recueillies suite à des épisodes épidémiques montrent que les symptômes oculaires peuvent apparaître au cours de la phase aiguë de l'infection (Balasundaram et al., 2010; Burnett et al., 1998; J. G. Montoya & Remington, 1996), ou plus tardivement (Leblanc et al., 1985). La toxoplasmose est ainsi l'une des principales causes d'uvéite postérieure dans le monde (Furtado et al., 2013; Petersen et al., 2012). Une étude récente estime que chaque année, 4839 personnes font un épisode symptomatique de toxoplasmose oculaire aux Etats-Unis (Jones & Holland, 2010).

La lésion typique de la chorioretinite toxoplasmique apparaît sur fond d'œil comme un foyer de nécrose rétinienne jaunâtre à bord flou souvent accompagné d'une réaction inflammatoire du vitré et de la chambre antérieure. La cicatrisation s'effectue de la périphérie vers le centre de la lésion, et entraîne une pigmentation variable de la cicatrice. L'atteinte peut être unilatérale ou bilatérale, et la lésion peut être unique ou multiple. Les récurrences sont fréquentes, et on observe alors la présence de cicatrices typiques sur la rétine (Commodaro et al., 2009; Ozgonul & Besirli, 2017).

Plus exceptionnellement, d'autres symptômes sévères peuvent être rapportés chez l'immunocompétent, et ils sont généralement liés à une infection par des souches non clonales peu fréquemment retrouvées en pathologie humaine. La consommation de viande de cheval importée d'Amérique du Sud a ainsi pu être associée à des cas de toxoplasmoses pulmonaires ou disséminées parfois mortels survenus en France et mettant en cause des souches atypiques (Pomares et al., 2011; Sobanski et al., 2013). Dans le village de Patam au Surinam, une épidémie liée à une souche atypique également a atteint 11 des 33 habitants, entraînant 8 toxoplasmoses disséminées chez des adultes immunocompétents, 1 décès et 2 cas de toxoplasmose congénitale létale (Demar et al., 2007). Des manifestations pulmonaires (Carme et al., 2002; Leal

et al., 2007), cardiaques (Chiappe Gonzalez et al., 2020; Roubille et al., 2012), cérébrales (Vastava et al., 2002) ou musculaires sévères (Cuomo et al., 2013) sont rapportées occasionnellement dans la littérature.

2. TOXOPLASMOSE CONGENITALE

a) Données physiopathologiques, cliniques et épidémiologiques

La toxoplasmose congénitale est causée par le passage transplacentaire de tachyzoïtes de la mère à son fœtus. Cela survient principalement lors d'une primo-infection pendant la grossesse, mais des transmissions liées à des réactivations au cours de la grossesse chez des femmes immunodéprimées (Marty et al., 1994), à des infections pendant la période pré-conceptionnelle (Villena et al., 1998) ou à des réinfections par des souches atypiques (Elbez-Rubinstein et al., 2009) ont également pu être rapportées (Lindsay & Dubey, 2011).

Les conséquences de l'infection du fœtus recouvrent un spectre large allant de la mort fœtale *in utero*, l'avortement spontané et l'atteinte disséminée, à l'absence de symptômes à la naissance, qui est la situation la plus fréquente. Dans ce cas, des manifestations oculaires ou neurologiques liées à l'infection peuvent cependant apparaître tardivement, dans l'enfance voire à l'âge adulte (Wallon et al., 2004). Lorsque des symptômes sont présents dès la naissance, les manifestations les plus couramment rencontrées sont oculaires (choriorétinite, microphthalmie, nystagmus, diminution de l'acuité...) ou neurologiques (hydrocéphalie, microcéphalie, encéphalomyélite, calcifications intracrâniennes...) (Dunn et al., 1999; Sabin, 1941).

L'incidence mondiale de la toxoplasmose congénitale a été estimée récemment à 190 000 cas par an, pour une charge associée de 1,2 millions de DALY (*Disability Adjusted Life Years*, score de morbidité correspondant au nombre d'années de vie en bonne santé perdues). Des variations géographiques en regard des chiffres de séroprévalence sont observées (Torgerson & Mastroiacovo, 2013). En France où près de 70% des femmes en âge de procréer ne sont pas immunisées, on a enregistré 3,1 séroconversions pour 1000 grossesses à risque en 2016, et environ 200 toxoplasmoses congénitales sont rapportées chaque année en l'état actuel du dépistage et de la prise en charge de l'infection maternelle (**Figure 17**) (Picone et al., 2020; Robinson et al., 2021).

Les principaux paramètres identifiés comme étant impliqués dans l'issue d'une séroconversion au cours de la grossesse sont l'âge gestationnel au moment de la séroconversion et le génotype en cause. Dans l'hémisphère nord où les souches de

type 2 prédominant largement en pathologie humaine, le risque de transmission au fœtus augmente en effet avec l'âge de la grossesse au moment de la séroconversion du fait d'une augmentation des échanges materno-fœtaux et d'une diminution de l'épaisseur de la barrière placentaire (Blaszowska & Górska, 2014). À l'inverse, plus la transmission se fait tardivement, plus la sévérité et le risque de lésions cérébrales décroît (**Figure 18**) (Dunn et al., 1999; The SYROCOT Study Group, 2007). De cette relation opposée entre risque de transmission et sévérité, il résulte que c'est lorsque l'infection s'acquiert entre 10 et 24 semaines de grossesse que le risque est le plus important pour le fœtus (Dubey et al., 2021). D'autre part, les données certes limitées de la littérature suggèrent une virulence plus importante des souches atypiques par rapport aux classiques souches de type 2 (Delhaes et al., 2010). Aussi certains cas cliniques rapportent-ils des atteintes sévères chez le fœtus à la suite d'une infection maternelle par une souche atypique parfois au troisième trimestre (Demar et al., 2007; Elbez-Rubinstein et al., 2009), et des études comparatives indiquent une sévérité des atteintes oculaires plus importante au Brésil où les souches atypiques sont plus courantes que dans l'hémisphère nord (Gilbert et al., 2008).

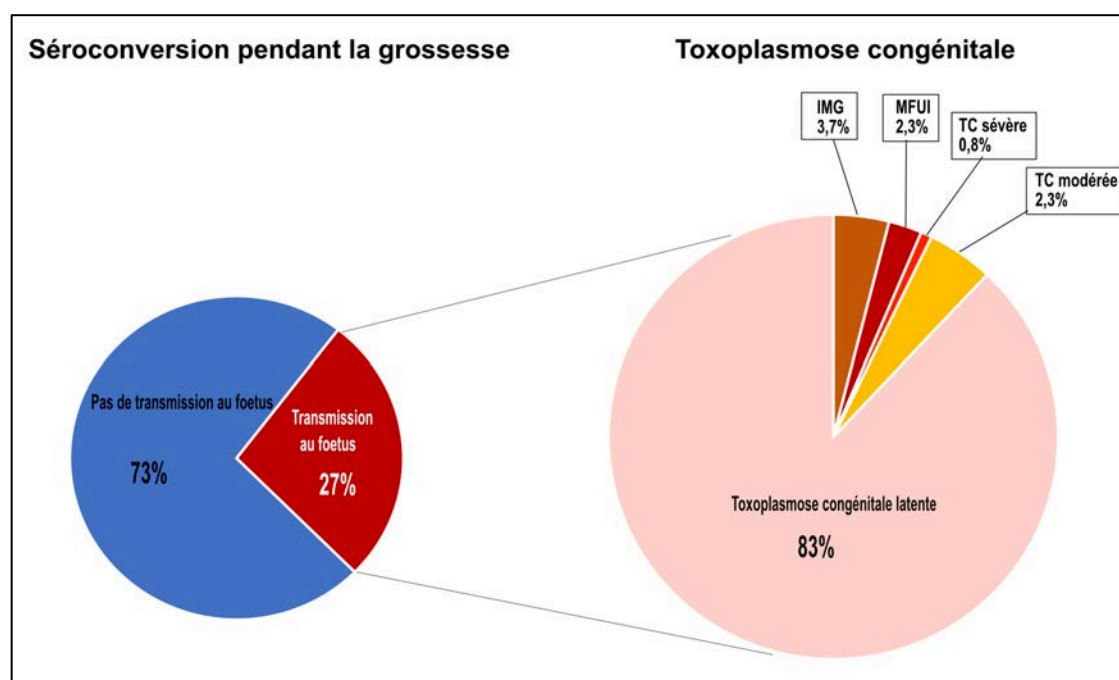


Figure 17. Risques pour le fœtus en cas de séroconversion au cours de la grossesse. Données françaises.

En France on enregistre chaque année entre 1000 et 1300 séroconversions pendant la grossesse. Environ 25 à 29% de ces séroconversions entraîneront une toxoplasmose congénitale. La majorité des toxoplasmoses congénitales sont des formes latentes asymptomatiques à la naissance. Les formes symptomatiques peuvent être modérées (calcifications intracrâniennes, chorioretinites périphériques) ou sévères (forme disséminées, hydrocéphalies...). En 2020, 133 cas de toxoplasmoses congénitales (TC) ont été diagnostiqués en France. Ils ont donné lieu à 5 interruptions médicales de grossesse (IMG), 3 morts fœtales in utero (MFIU), 1 cas de TC sévère et 6 cas de TC modérées. Diagramme réalisé à

partir des données de Picone et al., 2020 (Picone et al., 2020) et du CNR de la toxoplasmose (Centre national de référence & de la Toxoplasmose, 2021).

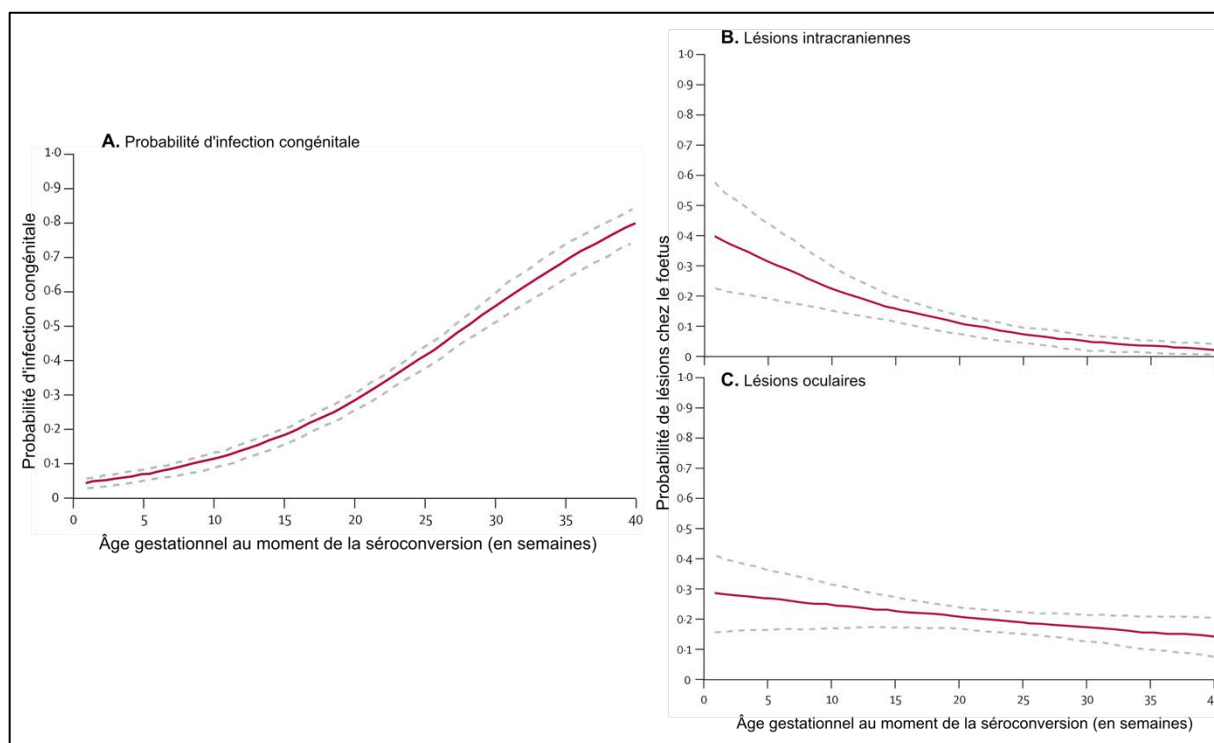


Figure 18. Évolution du risque d'infection congénitale et du risque de manifestations cliniques chez le fœtus en fonction de l'âge gestationnel au moment de la séroconversion.

Évolution du risque A) d'infection congénitale, B) de lésions intracrâniennes, C) de lésions oculaires, en fonction de l'âge gestationnel au moment de la séroconversion. Adapté de The SYROCOT study group, 2007 (The SYROCOT Study Group, 2007)

b) Prévention primaire – Recommandations hygiéno-diététiques

La prévention primaire contre la toxoplasmose consiste en un ensemble de mesures hygiéno-diététiques visant à limiter le risque d'infection. Elle s'adresse aux femmes enceintes non-immunes ainsi qu'aux patients immunodéprimés. Le Centre National de Référence (CNR) de la Toxoplasmose propose les mesures ci-dessous (Villena & Lachaud, 2019).

Pour limiter le risque de contamination par les kystes, il est ainsi recommandé (i) de bien cuire tout type de viande (y compris la volaille et le gibier) à 65 °C dans toute l'épaisseur et/ou de congeler les viandes à des températures inférieures à -18 °C ou à -12 °C pendant 3 jours afin d'inactiver les kystes, (ii) d'éviter la consommation de viande grillée, marinée ou fumée car ces procédés ne permettent pas d'inactiver les kystes.

Pour limiter le risque de contamination par oocystes, il est recommandé de (i) porter des gants pour jardiner ou pour tout contact avec de la terre, (ii) faire laver chaque jour, par une tierce personne, le bac à litière du chat avec de l'eau à plus de 70 °C, ou porter des gants, (iii) laver à grande eau les légumes et les plantes aromatiques, surtout s'ils sont terreux et consommés crus.

De manière générale l'hygiène des mains doit être renforcée, surtout après avoir manipulé de la viande crue, des crudités souillées par de la terre ou après avoir jardiné ou après contact avec les chats, et il est nécessaire de bien laver les ustensiles de cuisine et les plans de travail. En dehors du domicile, il faut veiller à ne consommer que de la viande bien cuite ; éviter les crudités et préférer les légumes cuits.

c) Stratégies de prévention de la toxoplasmose congénitale

La prévention de la toxoplasmose congénitale regroupe à la fois la prévention primaire et la prévention secondaire qui vise à diagnostiquer rapidement une éventuelle séroconversion au cours de la grossesse, à limiter la transmission transplacentaire au fœtus lorsque l'infection maternelle au cours de la grossesse est avérée, et à diagnostiquer et prendre en charge la toxoplasmose congénitale.

Les stratégies de prévention secondaire varient considérablement selon les pays en fonction de la séroprévalence, du risque d'infection et de considérations médico-économiques. Le screening sérologique des femmes enceintes pour la toxoplasmose est réalisé dans peu d'états. À l'échelle européenne, la France, l'Autriche, la Belgique, la Slovaquie, la Croatie, l'Italie, le Portugal, la Slovénie et depuis peu la Serbie rendent ce screening obligatoire à l'échelle nationale (van der Giessen et al., 2021), avec des modalités qui peuvent varier selon les pays. Avec la diminution constante de la séroprévalence de la toxoplasmose, le sujet de la pertinence des programmes de dépistage est régulièrement débattu. L'efficacité du programme français a récemment été confirmée par un panel d'experts (Picone et al., 2020) et par des études médico-économiques (Binquet et al., 2019). Cette surveillance s'inscrit dans un cadre légal depuis le décret n° 78-396 du 17 mars 1978 imposant une sérologie lors de la délivrance du certificat prénuptial. Ce décret a été aboli en 2007, mais le décret n° 92-143 du 14 février 1992, qui prévoit le dépistage obligatoire et la surveillance des femmes enceintes avant la fin du premier trimestre et jusqu'à la fin de la grossesse est toujours en vigueur. De plus, la prescription des recommandations hygiéno-diététiques pour les femmes enceintes non-immunes et les patients immunodéprimés est prévue par la circulaire du 27 septembre 1983 (Villena & Lachaud, 2019). Les modalités françaises de surveillance sérologique sont résumées

sur la **Figure 19**. Elle consiste à déterminer le statut sérologique de la femme enceinte par la recherche d'IgG et IgM anti-*Toxoplasma* au premier trimestre de grossesse. Chez les femmes antérieurement immunisées pour la toxoplasmose, la surveillance sérologique s'arrête là. L'absence d'immunité conduit à la préconisation de recommandations hygiéno-diététiques et à la surveillance sérologique mensuelle jusqu'à 1 mois après l'accouchement en vue de diagnostiquer rapidement une éventuelle séroconversion. Toute séroconversion suspectée ou confirmée au cours de la grossesse doit inciter à orienter la patiente vers une équipe ayant une expertise reconnue, en lien avec un Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic prénatal (CPDPN) (Mandelbrot et al., 2021).

En cas de séroconversion au cours de la grossesse, la prise en charge varie en fonction de l'âge de la grossesse au moment de la séroconversion (**Figure 20**). Une surveillance échographique rapprochée est systématiquement proposée afin d'identifier rapidement d'éventuelles lésions cérébrales et/ou extra-cérébrales en faveur d'une atteinte fœtale (Codaccioni et al., 2020). Les précédentes recommandations préconisaient l'administration de spiramycine à visée prophylactique jusqu'à preuve d'infection fœtale apportée par le diagnostic prénatal et la positivité de la recherche d'ADN parasitaire dans le liquide amniotique. Un traitement par Pyriméthamine-Sulfonamide (P-S) était alors recommandé. Le dernier essai randomisé multicentrique visant à comparer l'efficacité de la stratégie P-S par rapport à la spiramycine (TOXOGEST) indique une tendance à une efficacité supérieure de la P-S, qui devient significative lorsque le traitement est instauré dans les 3 semaines qui suivent la séroconversion (Mandelbrot et al., 2018). Aussi selon une récente proposition de prise en charge publiée par Mandelbrot et al., un traitement par P-S pourrait être recommandé en première intention en cas de séroconversion survenant après 14 semaines d'aménorrhée (SA) (Mandelbrot et al., 2021).

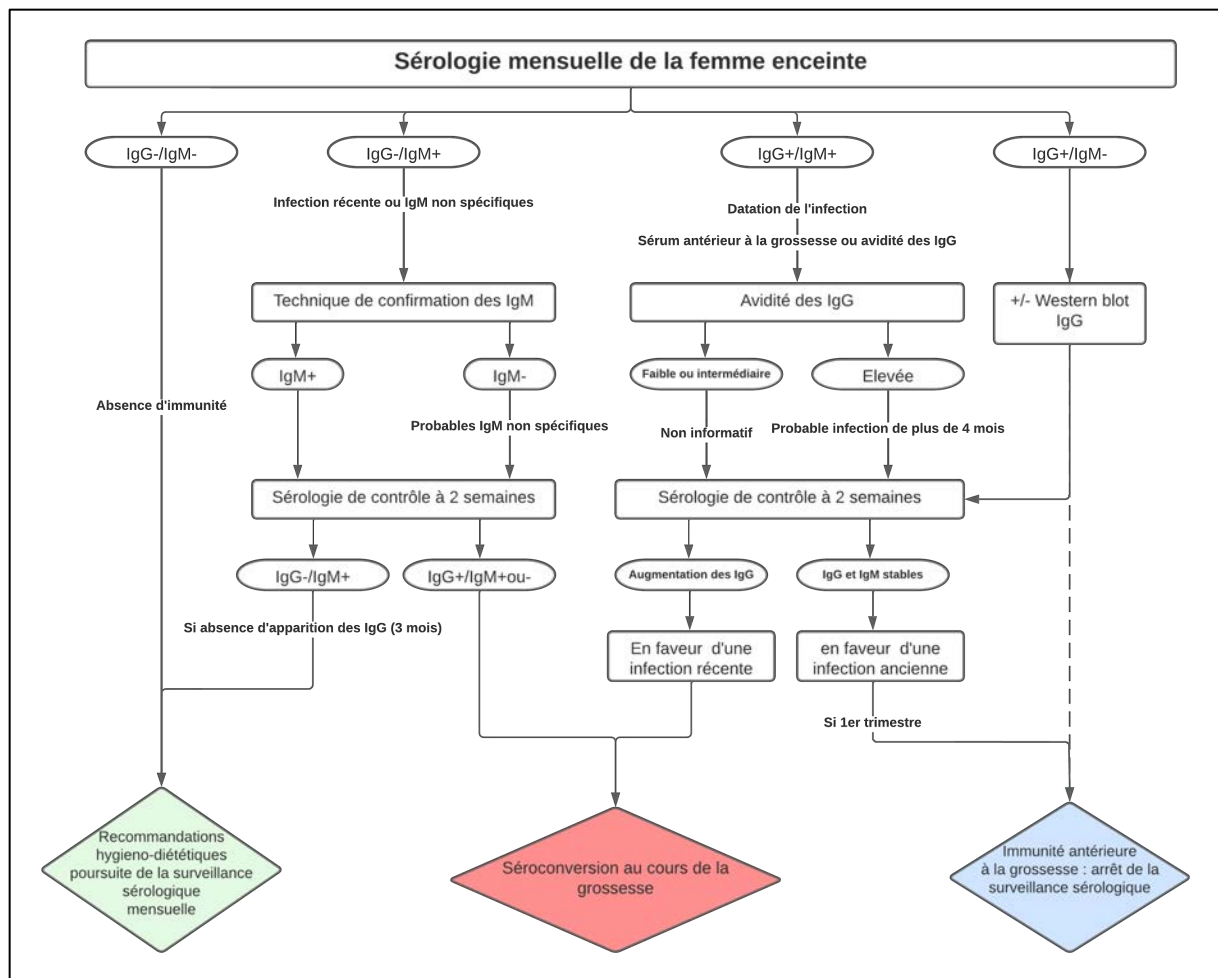


Figure 19. Logigramme de surveillance sérologique de la toxoplasmose chez la femme enceinte.

Adapté des recommandations de surveillance préconisées par le CNR de la Toxoplasmose. T1 : Premier trimestre de grossesse. Créé avec LucidChart (<https://www.lucidchart.com/>).

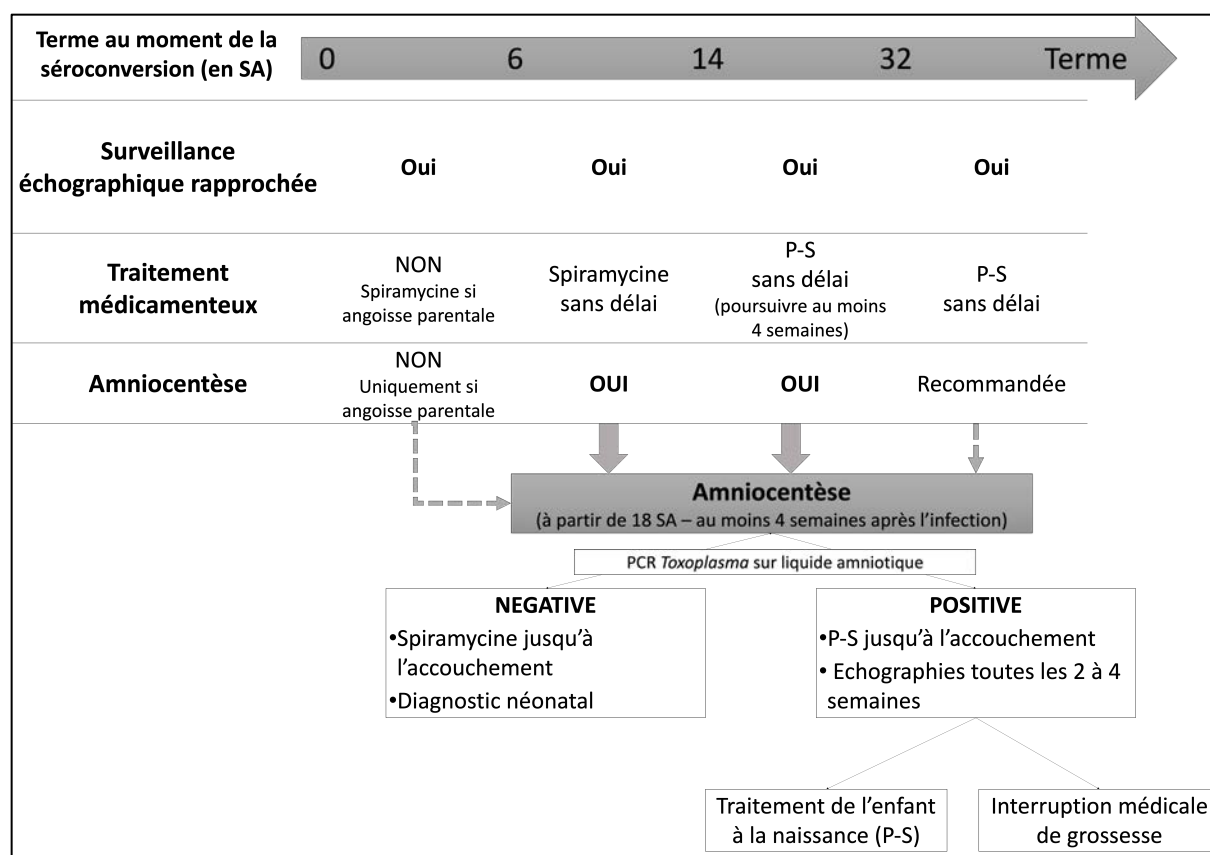


Figure 20. Stratégies de prise en charge d'une séroconversion maternelle en fonction de l'âge gestationnel. Selon les dernières propositions de prise en charge (Mandelbrot et al., 2021).

3. TOXOPLASMOSE DE L'IMMUNODEPRIME

La toxoplasmose est une pathologie opportuniste. Les patients immunodéprimés sont particulièrement exposés au risque de formes sévères et potentiellement mortelles. Diverses présentations cliniques peuvent être rencontrées, les plus fréquentes étant la toxoplasmose cérébrale, pulmonaire ou disséminée. Le risque et même la présentation clinique prédominante sont susceptibles de varier en fonction du degré, de la durée et du type d'immunodépression. Les exemples de la toxoplasmose en contexte d'infection par le VIH et de greffe sont présentés ci-dessous.

a) Toxoplasmose et infection par le VIH

Chez les sujets atteints de VIH, la toxoplasmose cérébrale est la principale manifestation clinique. Elle résulte dans 95% des cas d'une réactivation à partir de kystes, avec un risque corrélé au taux de lymphocytes T CD4⁺. Avant le développement des antirétroviraux, 30 à 50% des personnes co-infectées par le VIH et *T. gondii* développaient une toxoplasmose cérébrale au cours de l'immunodépression sévère (Luft & Remington, 1992). D'après une méta-analyse portant sur l'ère des antirétroviraux, la toxoplasmose cérébrale est encore la cause de

6% des hospitalisations et de 15% des décès chez les adultes vivants avec le VIH à travers le monde (Ford et al., 2015).

La clinique de la toxoplasmose cérébrale est aspécifique et dépend du nombre et de la localisation des lésions. Les signes cliniques fréquemment rencontrés sont les céphalées, la fièvre, les déficits neurologiques, les crises comitiales et la confusion. À l'IRM, la toxoplasmose cérébrale se présente sous la forme de lésions annulaires souvent multiples et entourées d'un œdème (Vidal, 2019).

Les formes extra-cérébrales, bien que rares, sont également possibles, et peuvent résulter de primo-infections. Des formes oculaires, pulmonaires ou disséminées peuvent être rencontrées avec ou sans localisation cérébrales concomitantes (Brion et al., 1992; Pelloux et al., 1992; Rabaud et al., 1994).

b) Toxoplasmose et greffe

La toxoplasmose dans le contexte de la greffe peut résulter d'une infection au cours d'une immunodépression – le risque est alors le même que dans la population générale et variable en fonction des régions, des conditions d'hygiène et des habitudes alimentaires – ou d'une réactivation ; cette dernière situation étant la plus fréquente. La présentation clinique est le plus souvent sévère avec des formes disséminées, pulmonaires, cérébrales, oculaires et cutanées décrites (Dard et al., 2018; Fricker-Hidalgo et al., 2009).

La situation de la toxoplasmose diffère selon qu'il s'agisse d'une transplantation d'organe solide (TOS) ou d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH). Une étude espagnole objective un risque de 0,14% dans le contexte de la TOS. Le risque le plus important concerne la réactivation à partir des kystes transmis par l'organe du donneur séropositif à un receveur naïf. Le muscle étant l'une des localisations préférentielles des kystes, la greffe cardiaque est particulièrement concernée et le risque au cours de la transplantation cardiaque (0,61%) est significativement plus élevé qu'au cours de tout autre type de greffe (Fernández-Sabé et al., 2012). Quelques études récentes de séries de cas suggèrent une incidence relativement élevée de la toxoplasmose post-allo-GCSH : 4% des 419 allo-GCSH consécutives d'un établissement parisien ont conduit à une toxoplasmose (Robin et al., 2019). L'allo-GCSH est plus à risque que l'auto-GCSH, et la situation la plus à risque est celle du receveur séropositif dont le donneur est séronégatif. La mortalité associée à la toxoplasmose chez les patients greffés, et d'autant plus post GCSH, est élevée (Robert-Gangneux et al., 2018).

Au cours d'une étude portant sur la période 2010-2014 impliquant 46 centres dans 11 pays européens, 87 cas de toxoplasmose dans le contexte de la greffe ont été rapportés dont 58 post allo-GCSH et 12 chez des greffés cardiaques (Robert-Gangneux et al., 2018). La présentation clinique était majoritairement sévère, mais des cas asymptomatiques diagnostiqués grâce à la surveillance systématique par PCR *T. gondii* ont également été rapportés. Les taux de survie à 2 et 6 mois étaient significativement plus faibles post allo-GCSH par rapport aux cas survenus après une TOS (Robert-Gangneux et al., 2018).

c) Stratégies préventives

Les mesures préventives, prophylactiques et préemptives pour limiter le risque et/ou les conséquences de la toxoplasmose chez l'immunodéprimé sont à adapter en fonction du contexte et du degré d'immunodépression.

Dans le contexte de la greffe, la détermination préalable du statut sérologique du donneur et du receveur est une mesure obligatoire dans certains pays, qui permet d'évaluer le risque pour le receveur, les recommandations et stratégies à adopter post-greffe.

De manière générales, les mesures de prévention primaires reposant sur les mêmes recommandations hygiéno-diététiques que celles proposées aux femmes enceintes séronégatives sont à adopter en cas d'immunodépression. Une stratégie préemptive s'appuyant sur le suivi régulier par PCR et/ou sérologie *T. gondii* peut être mise en place et est particulièrement recommandée dans les situations les plus à risque. Enfin, une chimioprophylaxie généralement par l'association triméthoprime / sulfaméthoxazole peut être proposée (Dard et al., 2018).

4. CONSEQUENCES SUSPECTEES

La persistance à long terme de *T. gondii* au niveau du système nerveux central soulève l'hypothèse de conséquences sur le comportement qui pourraient être liées à la présence du parasite. L'hypothèse de la manipulation des parasites voudrait en effet que ces derniers modifient à dessein et à leur avantage le comportement de leur hôte afin d'augmenter la probabilité de transmission. Certaines données concernant *T. gondii* chez l'animal tendent à corroborer cette hypothèse. Ainsi, plusieurs études décrivent la perte d'aversion des rongeurs chroniquement infectés pour l'urine de chat, comportement qui augmenterait le risque de prédation (Berday et al., 2000; Vyas et al., 2007). Une étude récente a cependant montré que l'infection induisait une diminution globale de la peur chez la souris, sans cibler spécifiquement le comportement vis-à-vis des félins. Le degré d'altération du comportement a par

ailleurs été corrélé à la charge en kystes intracérébraux, et à l'inflammation au niveau du SNC (Boillat et al., 2020). L'infection a également été corrélée à une altération du sommeil et une augmentation de la durée d'éveil chez la souris. L'atténuation de cet effet sous traitement par dexaméthasone suggère la participation d'une composante inflammatoire (Dupont et al., 2021).

Ces données chez l'animal ont encouragé la recherche de liens entre toxoplasmose et changements comportementaux voire désordres mentaux chez l'humain. Certaines études évoquent ainsi une association entre la toxoplasmose et les conduites addictives ou à risque, ou encore le risque d'accident de la voie publique (Cook et al., 2015; Flegr et al., 2002). Des biais analytiques entachent cependant la plupart de ces études (H. J. Johnson & Koshy, 2020).

En ce qui concerne les maladies mentales, une récente méta-analyse n'aura extrait que 50 études répondant aux critères d'inclusion sur les 2866 identifiées dans la littérature, ce qui illustre les faiblesses de bon nombre d'études sur le sujet (Sutterland et al., 2015). Cette analyse a mis en évidence une association entre séropositivité pour *T. gondii* et schizophrénie, trouble bipolaire, trouble obsessionnel-compulsif et dépendance, avec des odds ratio cependant relativement modestes (1,81 ; 1,52 ; 3,4 et 1,91 respectivement). Aucune association n'a été objectivée avec la dépression (Sutterland et al., 2015).

L'association entre toxoplasmose et maladie neurodégénératives a également été investiguée, et les plus récentes méta-analyses sont en faveur d'une absence d'association avec la maladie de Parkinson et une faible association avec la maladie d'Alzheimer (Nayeri Chegeni et al., 2019; Zhou et al., 2019). Une étude réalisée au CHU de Grenoble montre également l'absence d'association entre l'infection chronique par *T. gondii* et l'apnée du sommeil (Dard et al., 2020).

Enfin, certaines études épidémiologiques suggèrent une association entre la toxoplasmose et le cancer. Ainsi, Thomas et al. ont établi, à partir de l'incidence nationale du cancer du cerveau et des données de séroprévalence de la toxoplasmose dans 37 pays, que l'infection par *T. gondii* multipliait par 1,8 l'incidence des cancers cérébraux (Thomas et al., 2012). Cette coïncidence géographique a également été notée par une récente méta-analyse basée sur sept études d'observation impliquant plus de 2000 patients et 5000 témoins, et qui a abouti à l'estimation d'un odds ratio de 1,96 en faveur d'un risque accru de gliome, de méningiome et d'autres types de tumeurs cérébrales, associé à l'infection par *T. gondii* (Abdollahi et al., 2022). Cependant les études observationnelles sont

caractérisées par une grande hétérogénéité en termes de populations incluses et de définition de la tumeur.

De manière générale, ces études sont à interpréter avec précaution. Elles s'appuient le plus souvent sur le résultat sérologique à un instant donné pour affirmer l'infection chronique. Les performances des techniques utilisées peuvent varier en fonction des études, et cet unique résultat sérologique peut ne pas refléter le statut vis-à-vis de l'infection, entre autres parce que la sérologie peut redevenir négative après une infection avérée (Burrells et al., 2016; Rougier et al., 2017). Il faut également garder à l'esprit que ce type d'études, si elles peuvent mettre en évidence des associations, ne permettent en aucun cas d'établir des liens de causalités.

3. APERÇU DES OPTIONS THERAPEUTIQUES ET PROPHYLACTIQUES

Peu de molécules sont actuellement disponibles pour le traitement curatif ou prophylactique de la toxoplasmose. Aucune des molécules disponibles n'est de développement récent, et l'absence de drogue active sur les kystes est à déplorer (Dunay et al., 2018). D'autre part, les effets indésirables sont nombreux et fréquents, ce qui peut contraindre à l'arrêt prématuré des traitements (Ben-Harari et al., 2017).

Le traitement de référence actuel est une association synergique entre un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR) – la pyriméthamine -, et un inhibiteur de la dihydroptéroate synthase (DHPS), sulfadoxine ou sulfadiazine. Le cotrimoxazole qui associe le triméthoprim, un autre inhibiteur de la DHFR, et le sulfaméthoxazole peut également être utilisé (Duval et al., 2004). Certains macrolides (l'azithromycine et la spiramycine) ainsi que la clindamycine ont également une action contre *T. gondii* en inhibant l'ARN ribosomale de l'apicoplaste, et donc la machinerie traductionnelle de celui-ci.

L'atovaquone peut également être proposée, et agit en inhibant la chaîne mitochondriale de transport des électrons (**Tableau 2**) (N. C. Smith et al., 2021).

Tableau 2. Molécules et associations disponibles en traitement ou prophylaxie de la toxoplasmose.

Molécules ou associations	Utilisation	Commentaire
Pyriméthamine - Sulfonamide	▪ Traitement de première intention des formes sévères de toxoplasmose ▪ Toxoplasmose congénitale ○ Séroconversion maternelle après 14SA ○ Enfant à la naissance si TC confirmée	Association systématique à l'acide folinique (effets indésirables hématologiques et cutanés)
Triméthoprim - Sulfaméthoxazole	▪ Traitement des formes sévères de toxoplasmose lorsque le traitement de référence n'est pas possible ▪ Prophylaxie chez l'immunodéprimé	Association à l'acide folinique
Spiramycine	Prévention du passage transplacentaire en cas de séroconversion pendant la grossesse (avant 14 SA)	Parasitostatique Concentration dans le placenta
Azithromycine	▪ Pyriméthamine + azithromycine : 1^{ère} intention dans le traitement de la TO (M.-L. Dardé et al., 2018) ▪ Traitement des formes sévères de toxoplasmose lorsque le traitement de référence n'est pas possible ou en association avec celui-ci en 2^{ème} ligne	
Clindamycine	Traitement des formes sévères de toxoplasmose lorsque le traitement de référence n'est pas possible ou en association avec celui-ci en 2 ^{ème} ligne	
Atovaquone	Traitement des formes sévères de toxoplasmose lorsque le traitement de référence n'est pas possible ou en association avec celui-ci en 2 ^{ème} ligne	
Dapsone	Traitement des formes sévères de toxoplasmose lorsque le traitement de référence n'est pas possible ou en association avec celui-ci en 2 ^{ème} ligne	Effets indésirables cutanés et hématologiques

IV. DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE

Le diagnostic de la toxoplasmose s'appuie sur deux stratégies complémentaires : la recherche directe, désormais dominée par les techniques de biologie moléculaire, et la recherche indirecte *via* tout un panel de techniques sérologiques.

La stratégie et la combinaison de techniques est adaptée en fonction du statut immunitaire du patient et du contexte clinique. Le **Tableau 3** résume les grandes lignes de ces stratégies en fonction du contexte.

Tableau 3. Modalités diagnostiques en fonction du contexte clinique et immunitaire.

Patient	Indication	Stratégie	Technique
Immunocompétent	Suivi sérologique (grossesse)	Sérologie	▪ EIA IgG et IgM ▪ +/- avidité et techniques complémentaires (ISAGA, western blots) si grossesse
	Détermination du statut immunitaire (donneur/receveur)		
	Suspicion clinique de toxoplasmose aiguë		
Suspicion de toxoplasmose oculaire (Immunocompétent ou immunodéprimé)		Sérologie	▪ EIA IgG et IgM ▪ Western blots comparatifs (HA et sérum)
		PCR	Humeur aqueuse ou vitrée
Immunodéprimé	Suspicion clinique de toxoplasmose de l'immunodéprimé	PCR	Sang, LCS, LBA, biopsie selon présentation clinique
	Suivi systématique au cours de l'immunodépression	PCR	Sang
		Sérologie	EIA IgG et IgM
Fœtus	Diagnostic prénatal (séroconversion maternelle au cours de la grossesse)	PCR	Liquide amniotique
Nouveau-né	Séroconversion maternelle au cours de la grossesse	Sérologie	▪ EIA IgG et IgM ▪ ISAGA IgM et IgA ▪ Western blots comparatifs (mère/enfant)
		PCR	Sang de cordon, placenta, liquide amniotique à la naissance

1. BIOLOGIE MOLECULAIRE : ARTICLE 1

MOLECULAR DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS: RECENT ADVANCES AND A LOOK TO THE FUTURE

Auteurs : **Marie Gladys Robert**, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Cécile Garnaud, Hélène Fricker-Hidalgo et Hervé Pelloux

Résumé en français

La toxoplasmose est une infection parasitaire de répartition mondiale qui peut être particulièrement sévère lorsqu'elle est opportuniste ou congénitale. Son diagnostic nécessite des techniques précises et rapides qui reposent principalement sur la sérologie et la biologie moléculaire.

L'objectif de cette revue est de traiter du positionnement du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en fonction des différentes situations cliniques pouvant résulter d'une infection par *T. gondii*, et de détailler les développements récents de cette technique.

La littérature anglaise et française a été consultée avec les mots-clés suivants : 'Toxoplasmose', 'Diagnostic moléculaire' et 'PCR'.

Les techniques de biologie moléculaires ont révolutionné le diagnostic de la toxoplasmose et les pratiques ont considérablement évolué au cours des dernières décennies. Cependant, il existe encore un degré élevé d'hétérogénéité inter-laboratoire qui nuit aux comparaisons entre les résultats et les études. Des efforts de standardisation des pratiques sont en cours.

Éléments clés de l'article

- Le diagnostic moléculaire est, avec la sérologie, l'une des pierres angulaires du diagnostic de la toxoplasmose. Il est particulièrement utile chez les patients immunodéprimés, ainsi que pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale ou oculaire.
- Le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale repose sur la détection de l'ADN parasitaire dans le liquide amniotique. Il est proposé en cas de séroconversion maternelle pendant la grossesse ou de d'anomalies échographiques évocatrices d'une infection fœtale. Un résultat positif signe une toxoplasmose congénitale.
- Le suivi par PCR des patients immunodéprimés à haut risque est utile pour la détection et la prise en charge précoce de l'infection à *T. gondii*, en particulier chez

les patients séropositifs à risque de réactivation ou en cas de mismatch sérologique (donneur séropositif/ receveur séronégatif) lors de transplantations d'organes solides.

- Des protocoles standardisés pour le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose font défaut. Les performances diagnostiques, notamment la sensibilité et la spécificité, peuvent varier en fonction des techniques utilisées pour l'extraction et l'amplification de l'ADN. À ce jour, parmi les différentes méthodes de PCR de *T. gondii* décrites, la qPCR ciblant la séquence rep529 doit être privilégiée.
- À ce jour, aucun panel commercial syndromique n'inclut la détection de *T. gondii*.

REVIEW



Molecular diagnosis of toxoplasmosis: recent advances and a look to the future

Marie Gladys Robert^{a,b}, Marie-Pierre Brenier-Pinchart^{a,b,c}, Cécile Garnaud^{a,d}, Hélène Fricker-Hidalgo^a and Hervé Pelloux^{a,b,c}

^aService de Parasitologie-Mycologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France; ^bUniversité Grenoble Alpes, Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB), Grenoble, France; ^cCentre National de Référence Toxoplasmose - Pôle Biologie Moléculaire, France; ^dUniversité Grenoble Alpes, CNRS, CHU Grenoble Alpes, Grenoble INP, TIMC-IMAG, Grenoble, France

ABSTRACT

Introduction: Toxoplasmosis is a globally distributed parasitic infection that can be particularly severe when opportunistic or congenital. Its diagnosis requires accurate and rapid techniques that rely mainly on serology and molecular methods.

Areas covered: The aim of this review was to discuss the positioning of the molecular diagnosis of toxoplasmosis according to the different clinical situations possibly resulting from infection with *T. gondii*, and to detail recent developments in this technique. The English and French literature were searched with the following keywords: 'Toxoplasmosis', 'Molecular diagnosis' and 'PCR'.

Expert opinion: Molecular techniques have revolutionized the diagnosis of toxoplasmosis, and practices have considerably evolved over the past decades. However, there is still a high degree of inter-laboratory heterogeneity which impairs comparisons between results and studies. Efforts to standardize practices are underway.

ARTICLE HISTORY

Received 31 March 2021
Accepted 8 June 2021

KEYWORDS

Toxoplasmosis; molecular diagnosis; *Toxoplasma gondii*; maternal-fetal infections; opportunistic infections; PCR; LAMP

1. Introduction

Discovered in 1908 by Charles Nicolle and Louis Manceaux, *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan [1]. Owing to the multiple stages of its complex life cycle and its ability to infect a wide range of hosts, this parasite is highly successful and distributed worldwide. Indeed, although cats and other felids are its only definitive hosts, virtually all homeotherms – birds and mammals – can be intermediate hosts [2]. Of the latter, humans are accidental hosts.

The serological prevalence of *T. gondii* in human beings is variable and depends on dietary habits, standards of hygiene or weather conditions [3,4]. According to current estimates, *Toxoplasma gondii* infects approximately one third of the global population [5]. Three main modes of acquisition are described: (i) feco-oral, through the ingestion of water or raw vegetables containing oocysts shed in the environment by definitive hosts; (ii) carnivorous, through the consumption of undercooked infected meat containing cysts; and (iii) congenital, after primary infection during pregnancy. Solid-organ transplantation is also a well-known path of transmission, and considering that muscles frequently harbor cysts, heart transplant recipients are particularly at risk [6].

Phylogenetic analyses on *Toxoplasma* strains across the world have revealed that three closely related clonal genotypes referred to as type 1, 2 and 3, predominate in Europe and North America while a greater genetic diversity is encountered elsewhere and particularly in South America [7,8].

In Europe and North America, primary infection is asymptomatic in 80% of cases and when symptomatic, fever, myalgia,

asthenia or cervical adenopathy are generally experienced. Only rare cases result in severe symptoms [9]. Although unlikely, infections with South American strains more often result in retinochoroiditis and other severe and in some instances lethal forms [10,11].

The parasite is able to persist in tissue cysts after resolution of the symptoms and can be reactivated in the case of immunodepression. *T. gondii* infection is an opportunistic disease and immunocompromised patients are at risk of encephalitis, retinochoroiditis or disseminated toxoplasmosis [9,12]. Toxoplasmosis is also a threat during pregnancy since the parasite can be transmitted to the fetus with a risk that depends on the gestational age and result in a broad spectrum of symptoms including ocular and neurological sequelae or even fetal death [13,14]. In both situations, the early implementation of an adapted treatment requires a rapid and accurate diagnosis. Indeed, a delay in the diagnosis of immunocompromised patients results more often in severe consequences, and the early treatment of acute toxoplasmosis during pregnancy decreases the risk of congenital toxoplasmosis (CT) [15–18].

According to the clinical situation and the immune status of the patient, different techniques have been developed to diagnose *T. gondii* infection (i) indirectly through serological tests detecting mainly IgG or IgM [19] or (ii) directly by molecular methods. The latter, first performed in the late 1980s by Burg *et al.* has revolutionized the diagnosis of toxoplasmosis and rapidly outperformed other direct diagnostic techniques

Article highlights

- Molecular diagnosis is, along with serology, one of the cornerstones of toxoplasmosis diagnosis. It is highly accurate, and especially helpful in immunocompromised patients, as well as for the diagnosis of congenital or ocular toxoplasmosis.
- Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis relies on the detection of parasitic DNA in the amniotic fluid. It is proposed in case of maternal seroconversion during pregnancy or ultrasound features compatible with fetal infection. A positive result signs congenital toxoplasmosis.
- PCR follow-up of high-risk immunocompromised patients is helpful for the early detection and management of *T. gondii* infection, especially in seropositive patients at-risk for reactivation or in case of serological mismatch (seropositive donor/seronegative recipient) in solid organ transplants.
- Standardized protocols for molecular diagnosis of toxoplasmosis are lacking. Diagnostic performances, including sensitivity and specificity, may vary according to the techniques used for DNA extraction and amplification. To date, among the different *T. gondii* PCR methods described, qPCR targeting the rep529 sequence should be preferred.
- To date, no syndromic commercial panel includes the detection of *T. gondii*.

such as mouse inoculation or cell culture [20,21]. A huge diversity of molecular protocols using different extraction methods, gene targets, amplification or detection techniques have been described since. The present review aimed at considering the use of the molecular diagnosis of toxoplasmosis regarding the different clinical situations and to summarize the progress already made and that still needs to be achieved in this field.

2. Molecular diagnosis depending on the clinical context

Depending on the clinical situation and the immune context, the positioning of molecular techniques within the diagnostic strategy, as well as the matrices to be preferred, may vary. These differences will be discussed in the following paragraphs and are summarized in Table 1.

2.1. Congenital toxoplasmosis

T. gondii infection diagnosis in pregnant women mostly relies on serological tests. A few countries such as France, Austria or Italy have a serological screening program, whereas most countries, such as the USA, do not [22–24]. However, such systematic screening enables a prompt diagnosis of primary infection during gestation and therefore the early introduction of a prophylactic treatment, as well as the implementation of a follow-up strategy to detect a possible transmission to the fetus. Molecular diagnosis is, along with serology and ultrasound, one of the critical pillars of these strategies. It is also useful for the diagnosis in newborns.

2.1.1. Prenatal diagnosis

Congenital toxoplasmosis prenatal diagnosis aims at the early detection of fetal contamination in order to adapt therapeutic and medical care. It is proposed when a seroconversion is established or highly suspected in a pregnant woman, or in the case of compatible fetal abnormalities revealed by ultrasound.

Table 1. Clinical situations requiring the molecular diagnosis of toxoplasmosis. CSF: Cerebro-spinal fluid; D+: *T. gondii* seropositive donor; R-: *T. gondii* seronegative organ transplant recipient; BALF: broncho-alveolar lavage fluid.

Patient	Clinical situations	Samples for PCR analysis	Consequences of positive PCR results
Pregnant woman	Seroconversion during pregnancy	Amniotic fluid	Diagnosis of congenital toxoplasmosis
Newborn	Maternal seroconversion during pregnancy without positive result of amniotic fluid	Placenta	High suspicion of congenital toxoplasmosis
	Clinical suspicion of congenital toxoplasmosis	Cord blood, neonatal amniotic fluid	Diagnosis of congenital toxoplasmosis Diagnosis of congenital toxoplasmosis
Immunocompetent or immunocompromised patient	Ocular disorder (retinochoroiditis, posterior uveitis ...)	Blood, CSF, urine Aqueous humor or vitreous humor	Diagnosis of ocular toxoplasmosis
Immunocompromised patient at risk of:		Blood (regular screening)	Suspicion or diagnosis of disseminated toxoplasmosis
- Clinical reactivation (hematopoietic stem cell transplant, HIV, cancer, acquired and congenital immune deficiency)	- Positive serology and deep immunodeficiency		
- Mismatch (D+/R-) in solid organ transplant patient	- Negative serology and solid organ transplant by seropositive donor		
- Primary infection (food, environment)	- More rarely: negative serology and deep immuno deficiency		
Immunocompromised patient with nonspecific signs of infection	Fever and clinical signs related to the organ involved	Blood	Diagnosis of disseminated toxoplasmosis
		CSF	Diagnosis of cerebral toxoplasmosis
		BALF	Diagnosis of pulmonary toxoplasmosis
		Biopsies	Suspicion or diagnosis of toxoplasmosis

Prenatal microbiological diagnosis consists of the detection of *T. gondii* or its DNA in the amniotic fluid (AF). Amniocentesis should be performed under ultrasound guidance after 16 to 18 weeks of gestation and at least 4 weeks after maternal infection to limit the risk of false-negative results due to the delayed transmission of the parasite to the fetus [25]. Historically, cell culture or mouse inoculation tests were used for the *in vitro* or *in vivo* isolation of the parasite from AF. For a few decades, molecular diagnosis has displaced these former techniques. Indeed, the turnaround time is less than 24 h with molecular techniques vs weeks for the inoculation of mice, and PCR is more sensitive than the latter approach [26]. Today, cell culture has practically been abandoned because of its low sensitivity, and mouse inoculation is still performed in some reference centers in order to isolate *T. gondii* strains for epidemiological purposes.

The introduction of quantitative real-time PCR techniques in diagnosis has enabled the determination of the parasite load in the AF, which could be relatively low [27]. A correlation between parasite load and clinical signs has also been investigated. Costa *et al.* suggested that a high parasite count tended to be associated with ultrasonographic abnormality, even if the main contribution factor remained early maternal infection [27]. Romand *et al.* showed that maternal infections acquired before 20 weeks with a parasite load greater than 100 parasites/mL of AF had the highest risk of severe fetal outcomes while Yamamoto *et al.* also noticed an association between parasite load and clinical outcomes but regardless of the gestational age at the time of maternal infection [28,29]. However, the influence of parasitic load on fetal prognosis is still debated. Quantification is not standardized and still shows significant variations between laboratories [30]. Only the qualitative results are therefore generally released, and to date, the management of CT do not depend on this parasite load.

According to the most recent studies evaluating the efficiency of PCR in AF from women presenting evidence of acute infection during pregnancy, the sensitivity of this approach varied between 86.3% and 98.3% and the specificity was 100% [31–35]. The delayed transplacental passage of parasites after amniocentesis or very low parasite load in AF could explain the rare false-negative cases. Despite these exceptional situations, a negative result is meaningful as it considerably lowers the probability that transmission of *T. gondii* occurred, particularly when maternal primary infection was acquired from the midterm [31].

In the case of a positive result, whatever the parasite load, CT is confirmed. Thus, treatment with the pyrimethamine – sulfadiazine and folinic acid combination and a close ultrasound monitoring are generally recommended. Medical termination of pregnancy is only discussed if fetal abnormalities are detected by medical imaging and molecular diagnosis can be used to test tissues of the aborted fetuses and confirm fetal infection [36].

2.1.2. Postnatal diagnosis

Even in countries in which routine antenatal surveillance for CT is performed, postnatal screening is necessary, as amniocentesis is not done in about one third cases of infection during pregnancy for personal or medical reasons [32,37].

When amniocentesis is performed, the risk of false-negative results of a PCR test on AF also justifies further follow-up after birth.

This postnatal screening relies on neurological and retinal examinations, medical imaging and biological tests. Of the latter, serological assays play a key role in the postnatal diagnosis of *T. gondii* infection, in that the appearance of specific IgM, IgA or neosynthesized IgG or the persistence or the increase of specific IgG by 12 months of age are sufficient to establish the diagnosis of CT [38]. Nevertheless, molecular diagnosis is also contributive and is complementary to serology. Samples collected at delivery are of particular interest as they may enable an earlier diagnosis than the serological follow-up [31,37,39]. Placental tissues or cord blood are generally proposed, even though the usefulness of placental examination has been questioned in one study showing a poor sensitivity of 25% in this type of sample [40]. This result must be interpreted with caution because the majority of the 785 placentas analyzed were tested by mice inoculation, and the design of that study does not allow a distinction between the performance of this method and PCR. Furthermore, better performance is generally reported in the most recent publications, with a sensitivity ranging from 71% to 79.5% and specificity from 92% to 97% [31,37]. However, the detection of *Toxoplasma* DNA in the placenta does not lead to a definitive conclusion of CT and has to be confirmed by other methods as the transmission of the parasite to the fetus cannot be evidenced [31,37,39,40]. In contrast PCR performed on cord blood is 100% specific [31]. It should also be noted that treatment with pyrimethamine–sulfadiazine decreases the sensitivity of placental PCR, which is higher when maternal infection occurs in the third trimester since exposure to treatment is then shorter [37,39].

The molecular diagnosis of CT in AF collected at delivery has recently been evaluated and an overall sensitivity of 54% and a specificity of 100% have been reported [41]. As observed with the placenta, the sensitivity of the PCR in neonatal AF tends to be higher when maternal infection is diagnosed during the third trimester [41]. In addition to its perfect specificity, neonatal AF requires a simple preanalytical step whereas placentas have to be ground before processing, but the latter is easily obtained, while collecting AF at birth is not always possible as waters breaking can occur before admission to a maternity hospital.

In the absence of a systematic follow-up program for CT during pregnancy, congenital infection is sometimes only suspected based on clinical signs at birth or even much later because symptoms can appear after several months or years [42]. In these situations, molecular diagnosis can be performed in peripheral blood, cerebro-spinal fluid (CSF) or urine and also profitably complement serology [43–46]. Sterkers *et al.* showed from a cohort of 12 newborns that PCR on neonatal peripheral blood could confirm the diagnosis of CT with a sensitivity of 83%, and that PCR could be the first positive test [43]. The sensitivity and specificity of CSF PCR were evaluated in a study on a cohort of infants born from an untreated mother. The authors reported an overall sensitivity of 46.5% and a specificity of 100%. The sensitivity was higher when the infants presented major clinical signs [44].

2.2. Toxoplasmosis in immunocompromised patients

Immunocompromised patients are particularly at risk of severe and potentially fatal toxoplasmosis, which results mainly from the reactivation of a chronic infection and more rarely from a primary infection or, in the case of solid organ transplant, from the transmission of *T. gondii* encysted in the graft from a seropositive donor to a seronegative recipient. Various clinical presentations may be encountered, with the most frequent being cerebral, pulmonary or disseminated toxoplasmosis [9]. These urgent situations require immediate treatment and therefore a quick diagnosis. However, serological tests may lack sensitivity in this population. Direct diagnostic techniques are of great interest. Among them, molecular diagnosis is an essential option as it is sensitive and fast. Its effectiveness is, however, relatively difficult to evaluate in the particular context of toxoplasmosis in an immunocompromised patient, because the definitive diagnosis is often based on a combination of clinical and paraclinical arguments [47]. Nevertheless, in a recent review of the practice in 11 European countries regarding toxoplasmosis in transplant recipients, PCR has been shown to be the most useful diagnostic tool, surpassing imaging and serology [48]. The use of PCR in the diagnosis of cerebral, pulmonary and disseminated toxoplasmosis is discussed in the following paragraphs. Ocular toxoplasmosis is treated separately below as it also concerns immunocompetent patients.

2.2.1. Cerebral toxoplasmosis

In the case of suspicion of cerebral toxoplasmosis, molecular techniques can be performed on brain biopsies to achieve a definitive diagnosis, but this parasitological confirmation can also be provided by the molecular analysis of the CSF. In a recent review, the difficulties regarding the analysis of the literature on the molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients were highlighted [49]. Beyond the technical disparities that complicate the comparison of different studies irrespective of the clinical context, the literature on cerebral toxoplasmosis is mainly based on cohorts of HIV patients prior to the introduction of combination antiretroviral therapy. The data are therefore based on outdated and variable molecular techniques and small case series of patients with a similar immunological background. Consequently, the results for performance are disparate (with sensitivity ranging from 12% to 100% and specificity from 86% to 100% [50–63]), and are scarce concerning the other populations at risk of cerebral toxoplasmosis, such as transplant recipients [64,65]. Nevertheless, most studies report a specificity of 100%, suggesting that although a diagnosis of cerebral toxoplasmosis cannot be ruled out in the face of a negative CSF PCR, a positive result is useful for confirming the diagnosis. It should be noted, however, that the sensitivity of the PCR is altered by the treatment. It has indeed been shown that CSF collection should be performed no later than one week after the introduction of anti-*Toxoplasma* treatment to optimize diagnostic performance [63].

Parasitemia may be concomitant with neurological symptoms. Molecular methods performed in blood samples may then be a noninvasive option to confirm the diagnosis of

Toxoplasma encephalitis, especially when a lumbar puncture is not feasible due to expansive cerebral lesions. Again, sensitivity vary greatly from one study to another, from 1.5% to 80%, but specificity is generally around 100% [53,54,66–71]. Moreover, Ajzenberg *et al.* recently showed that PCR sensitivity in blood samples increased with the severity of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients [71]. Interestingly, two South-American studies conducted under similar conditions have led to discordant results on sensitivity, highlighting the difficulties in comparing different studies [59,69,72].

2.2.2. Disseminated and pulmonary toxoplasmosis

Molecular methods can also be used to diagnose pulmonary and disseminated toxoplasmosis. According to the clinical presentation, it can be performed on blood, broncho-alveolar lavage fluid (BALF), sputum, bone marrow aspirations, ocular samples, skin or any kind of biopsies. Due to the diversity of clinical presentations and the rapidly lethal evolution, the literature evaluating the value of molecular diagnosis in the context of pulmonary and disseminated toxoplasmosis is limited. Several clinical cases seem to show that molecular diagnosis is relevant. Indeed, in a few case reports *T. gondii* PCR tests have been retrospectively performed on different samples from patients diagnosed with disseminated toxoplasmosis and the results suggest that this method could have allowed for an earlier diagnosis [73,74]. Desoubreaux *et al.* recently published a study comparing the results of microscopy and molecular methods performed on BALFs from immunocompromised patients collected prospectively over 2 years [75]. They concluded that PCR was not superior to classical microscopy when the latter was performed by experienced microscopists. However, this condition cannot always be met, and beyond improving sensitivity, molecular methods also allows for standardization.

2.2.3. Follow-up of high-risk patients

If molecular diagnosis could be used when toxoplasmosis is suspected based on clinical and imaging findings, it is also helpful as a systematic screening test in high-risk patients for the early detection of *T. gondii* infection, before the onset of clinical signs.

Suggested as soon as the early 2000s by Bretagne *et al.* [76], the PCR follow-up of high-risk patients for *T. gondii* DNA has been proposed by several authors [77–80]. It is now implemented mostly on a weekly basis in different centers; for example following stem-cell transplant [81]. Robert-Gangneux *et al.* recently published a 3 year multicenter retrospective study which pointed that 48% of allogeneic hematopoietic stem cell transplanted patients (allo-HSCT) presenting *T. gondii* positive PCR in centers applying a systematic PCR follow-up policy were asymptomatic and that the survival of allo-HSCT was improved in centers with PCR follow-up compared to other centers, highlighting the positive impact of this practice [82].

2.3. Ocular toxoplasmosis

Ocular toxoplasmosis is a possible clinical manifestation after congenital or postnatal infection. It concerns

immunocompetent and immunocompromised patients, with a clinical presentation that differs depending on the host and the genotype of the parasite [83]. Toxoplasmosis is recognized as one of the most common causes of posterior uveitis worldwide [84]. Typical lesions are classically diagnosed by ophthalmic examination, but the clinical presentation may be atypical, and in this case, complementary biological tests are essential to confirm the etiology. Molecular diagnosis performed on ocular samples – i.e. easily removable aqueous humors or vitreous humors requiring a more invasive procedure – is one of these biological tools and is proposed in diagnostic algorithms by various authors in combination with blood serology, immunoblotting or the calculation of the Goldmann–Witmer coefficient [85,86]. Indeed, the sensitivity of PCR alone range from 30% to 67% depending on the studies, while sensitivity is improved and can reach 97% upon combining molecular and serological assays [86–90]. It should be noted that molecular diagnosis provides better sensitivity in immunocompromised patients [86,87]. The study of Talabani *et al.* showed that this method was the most helpful in this population, as in their cohort of patients with atypical uveitis, PCR was the only positive test for 4 immunocompromised patients. In addition, it was shown that PCR was more efficient than immunoblotting in immunocompetent patients if the aqueous humor was sampled soon after the first clinical signs [90].

Blood samples have also been proposed by authors for the diagnosis of ocular toxoplasmosis, but the performance with this sample has recently been evaluated by Bourdin *et al.*, who found a poor sensitivity of 4.1% to 25% when using 200 μ L or 2 mL of whole blood respectively, confirming the need for ocular samples [91,92].

2.4. Other severe forms of toxoplasmosis in immunocompetent patients

Although severe forms in immunocompetent individuals are rare, cases of pneumonia, hepatitis, myocarditis or even disseminated toxoplasmosis caused by either South American or European strains are regularly reported [93–95]. The diagnosis essentially relies on serology, but even if the data are too scarce to clearly establish significance of molecular techniques in such cases, it seems that it could play a role. Indeed, in the most recent case reports diagnosed through the presence of *T. gondii*-specific IgM or a significant increase in IgG anti-*T. gondii* antibody titers in patients' sera, detection of *T. gondii* DNA in BALF, CSF or biopsies is often used as a confirmatory method [96–98]. Levêque *et al.* recently published a case of myopericarditis in an immunocompetent patient diagnosed early by *Toxoplasma* PCR in the peripheral blood while serological tests were still negative, suggesting that molecular diagnosis could be the first positive biological assay and should be performed even if serological tests are negative when acute toxoplasmosis is highly suspected [99]. Furthermore, cerebral toxoplasmosis is extremely rarely reported but also highly difficult to diagnose in immunocompetent patients. In a recent case report, cerebral toxoplasmosis was only diagnosed through *T. gondii* PCR on brain tissue

samples while PCR in CSF and serology were both uninformative, suggesting that molecular diagnosis could also be helpful in this difficult context [100].

3. Evolution of *Toxoplasma* molecular diagnosis

The preceding paragraphs summarize the importance of molecular techniques in the prevention and diagnosis of *T. gondii* infection. In a few decades, they have become essential and are part of diagnostic algorithms, whatever the nosological entity under consideration. However, many laboratories develop and use in-house techniques, which differ widely from one laboratory to another and may also vary in terms of performance, whereas sensitivity is a key issue with regard to the diagnosis of *T. gondii* infection because the parasite load is frequently low. There are no commonly accepted international guidelines for standard practice. Such standardization is warranted to allow for the better comparability of results between laboratories and between different clinical studies.

The second part of this review focuses on the evolution of the different steps in the molecular diagnosis of *T. gondii* infection, highlighting those that improve its performance. The current recommendations and consensus regarding these different steps are summarized in Figure 1.

3.1. Preanalytical treatments

The pre-treatment methods applied to samples may vary from one laboratory to another.

The molecular diagnosis of toxoplasmosis is not performed in all medical biology laboratories. Routing to expert laboratories is therefore a step that must be controlled as storage condition can affect DNA extraction and thus, PCR efficiency. The impact of sample storage duration on *T. gondii* PCR efficiency was therefore recently assessed using spiked samples from five different matrices (i.e. AF, CSF, BALF, whole blood and buffy coat). The authors concluded that the samples could be stored for 7 days at +4°C, assuming that they could be analyzed in multiplicate [101].

For CSF, AF, aqueous or vitreous humors, DNA extraction should be performed on the centrifugation pellet to increase PCR sensitivity. The detection of parasitemia is performed on serum, plasma, whole blood or buffy coat depending on the authors and the laboratories [71,73,87,110,111]. However, Brenier-Pinchart *et al.* recently showed on a mouse model the superiority of buffy coat from a large volume of blood vs whole blood to improve *T. gondii* PCR sensitivity [112].

3.2. DNA extraction

DNA extraction is the first step in the molecular diagnostic process, and its optimization should not be neglected, otherwise the efficiency of the parasite detection might be reduced. Although manual extraction methods are still widely used in some countries, such as France, the trend is toward automation, which allows this step to be standardized and facilitates its integration into the routine activity of the laboratory [102,113]. In a multicenter evaluation study, Yera *et al.*

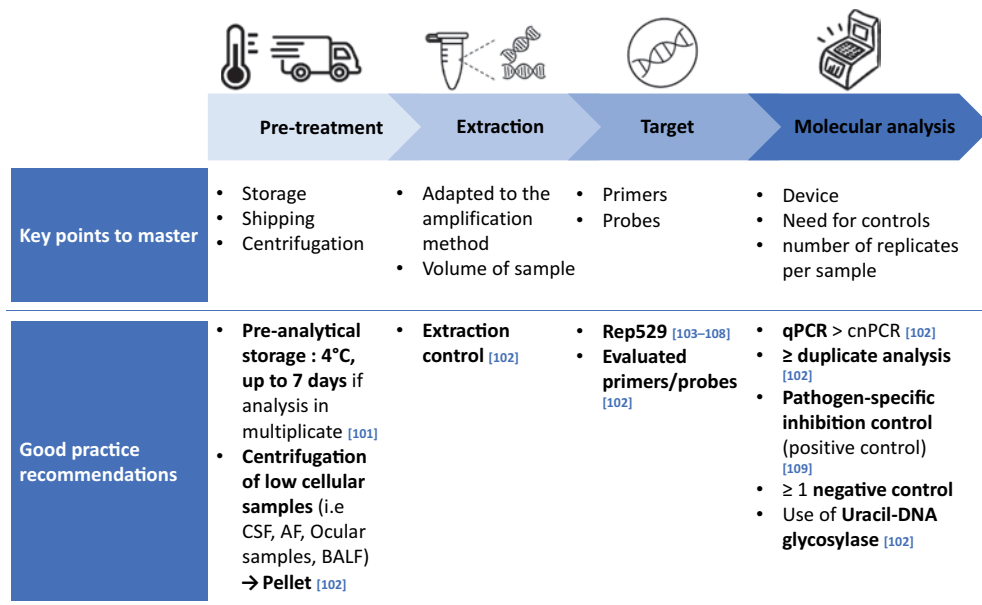


Figure 1. Steps of the molecular diagnosis of toxoplasmosis: key points, recommendations and consensus. AF: amniotic fluid; CSF: cerebrospinal fluid; BALF: broncho-alveolar lavage fluid; cnPCR: conventional PCR; qPCR: quantitative PCR.

compared five commercially available manual and automated *T. gondii* DNA extraction methods from AF and concluded that if manual and automated methods performed equally at high *T. gondii* concentrations, results were more contrasted at low concentrations. All automated methods were not equivalent, and the MagNA Pure Compact (Roche) and the BioRobot EZ1 (Qiagen) proved to be more efficient than the manual methods evaluated – i.e. the QIAamp DNA minikit (Qiagen) and the High Pure PCR template preparation kit (Roche) – at low concentrations [114]. Zhao *et al.* recently compared an automated method – the eMAG (bioMérieux) – with a manual method – the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) – for artificially spiked CSF, BALF and buffy coat and showed better performance for the automated method, especially for low-concentration samples [115]. Faucher *et al.* also succeeded in improving the *T. gondii* DNA extraction of an automated method by integrating a proteinase K pre-treatment step [116]. These data underline the importance of adapting the extraction method to the subsequent PCR method.

3.3. Gene targets

Since the introduction of the molecular diagnosis of *T. gondii* infection, various target genes have been described in the literature and used in medical laboratories. The main ones are the *SAG1* (P30) protein coding gene found in a single copy in the genome, the *B1* sequence (GenBank accession number AF179871) repeated 35 times, the 110-fold repeated 18S rDNA gene and a 529 bp non-coding sequence repeated 200 to 300 times in the *T. gondii* genome commonly termed '*rep529*' (GenBank accession numbers AF146527 and AF487550) [20,117–119]. The *TGR1E* sequence and the α - and β -*tubulin* genes could also have been targeted but more rarely

[120–122]. Among all these, the *B1* gene was the first used for toxoplasmosis diagnosis and has been widely employed for years. Different primers targeting this gene have been designed for this purpose [20,67,123–127]. However, this target is being replaced by the *rep529*. Various teams have also designed primers for the latter (Table 2) [37,89,90,103–105,119,128]. If the superiority of this target could be anticipated due to the high number of its repetitions – indeed, increasing the number of copies of a target sequence theoretically improves the detection of the parasite –, it is now unanimously recognized following the publication of several comparative studies [103–108]. It was also confirmed by a multicentric prospective study performed in eight laboratories invited to proceed with their own molecular detection of *T. gondii* using the *B1* and/or the *rep529* target from the same sample. The parasite detection was more successful with the *rep529* target, irrespective of the PCR method in use in the laboratory [129]. However, some authors have questioned the presence of this target in all strains, when others have suggested that it was not adapted to the diagnosis of atypical genotypes [128,130]. Indeed, in a comparative study performed on 189 positive AF samples from Brazilian pregnant women, Okay *et al.* showed that only 37% tested positive with the *rep529* target vs 87% with the *B1* target [130]. However, the Brazilian study of Camilo *et al.* contradicts this hypothesis [131]. The authors compared both targets in a retrospective and prospective study and concluded that the *rep529* provided better performances in a South American cohort. This question was also assessed by Pomares *et al.* in a recent study comparing the results of a *B1* and two *rep529* quantitative PCR (qPCR) assays on 13 type II and 21 non-type II strains collected in North America. They showed that the Ct values for *rep529* qPCRs were significantly lower than *B1* qPCR for both type II

Table 2. Non-exhaustive list of published methods targeting *rep529*.

Reference	Amplification method	Primer sequence	Probe sequence
Homan <i>et al.</i> , 2000 [119]	cnPCR	5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3' 5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'	
Reischl <i>et al.</i> , 2003 [105]	qPCR (FRET)	5'-AGGAGAGATATCAGGACTGTAG-3' 5'-GCGTCGTCTCGTCTAGATCG-3'	5'-GAGTCGGAGAGGGAGAAGATGTT-3' (donor) 5'-CCGGCTTGGCTGCTTTCTCTG-3' (acceptor)
Cassaing <i>et al.</i> , 2006 [104]	qPCR (FRET)	5'-AGGCGAGGGTGAGGATGA-3' 5'-TCGTCTCGTCTGGATCGAAT-3'	5-GCCGGAAACATCTTCTCCCTCTCC-3' (donor) 5'-CTCTCGTCGCTTCCCAACACG-3' (acceptor)
Fekkar <i>et al.</i> , 2008 [89]	qPCR (Taqman)	5'-GAAAGCCATGAGGCACTCCA-3' 5'-TTCACCCGGACCGTTTAGC-3'	5'-CGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGATACA-3'
Talabani <i>et al.</i> , 2009 [90]	qPCR (Taqman)	5'-TGGTTGGGAAGCGACGAGAG-3' 5'-CATCACCGAGGAAAGCGTC-3'	5'-AG[A]GA[C]AC[C]GG[A]ATGCG[A]T-3'
Menotti <i>et al.</i> , 2010 [103]	qPCR (Taqman)	5'-CTTCGTCCAAGCCTCCGA-3' 5'-GACGCTTCTCTCGTGGTAT-3'	5'-CCCTCGCCTCTTCTCCTACTTCAA-3'
Wahab <i>et al.</i> , 2010 [128]	qPCR (Taqman)	5'-GCTCCTCCAGCCGCTTG-3' 5'-TCCTCACCTCGCCTTCAT-3'	5'-AGGAGAGATATCAGGACTGTA-3'
Robert-Gangneux <i>et al.</i> , 2010 [37]	qPCR (Taqman)	5'-AGAGACACCGAATGCGATCT-3' 5'-TTCGTCCAAGCCTCCGACT-3'	5'-TCGTGGTATGGCGGAGAGAATTGA-3'

Footnote: cnPCR: conventional PCR; qPCR: quantitative PCR; FRET: fluorescence resonance energy transfer.

and non-type II and thus confirmed the suitability of this target for such strains [132]. A survey from the French National Reference Center for Toxoplasmosis illustrated the decrease in the use of the target *B1* in French medical laboratories, which dropped from 29.7% in 2008 to 3.7% in 2015 in favor of *rep529* [102]. The preferential use of this DNA target is one of the few points of consensus in the molecular diagnosis of *T. gondii* infection.

3.4. Amplification methods

As reviewed by Robert-Gangneux and Belaz, conventional (cnPCR) and nested PCR have now given way to qPCR in industrialized countries but are still largely used in developing countries [49]. qPCR is based on the measurement at each cycle of the fluorescence of a molecule introduced into the reaction mixture in order to detect the DNA amplification. This molecule can be either a nonspecific DNA marker (e.g. SYBR Green) or a fluorescent probe. The latter strategy is preferred because of its greater specificity, and it consists of the use of either laboratory-developed Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) or hydrolysis probes (e.g. TaqMan®). qPCR has considerable advantages: the use of probes increases specificity, no post-amplification manipulations are needed (which is time-saving and limits the risk of carry-over contamination), it is possible to amplify different targets in the same assay (which allows for the inclusion of an internal control) and it allows the parasitic load to be quantified [133,134]. This molecular method allows high-throughput detection, and some authors have suggested that it is the most efficient method for the molecular diagnosis of toxoplasmosis. Indeed, Nagy *et al.* and Teixeira *et al.* compared cnPCR and qPCR and concluded that their qPCR assays were the best-performing techniques for the detection of *T. gondii* from AF [33,135]. This may be a subject of controversy, since certain qPCR assays may also not perform well and even perform worse than excellent cnPCR assays [124,129,134–136]. However, qPCR robustness undoubtedly simplified and improved the molecular diagnosis of toxoplasmosis and is now being used in a growing number of laboratories. The survey of the French National Reference Center for

Toxoplasmosis shows that after 2012, cnPCR and nested PCR were no longer used by respondent laboratories, and had been replaced by qPCR [102]. As previously mentioned, the latter method enables a quantification of the pathogen. To date, the quantification results are too variable to consider taking this information into account in the management of the patient. To pave the way for the improvement of the accuracy of this measurement, the French National reference center for Toxoplasmosis provides a lyophilized preparation of *T. gondii* as common standard [138,139].

Recently another molecular method has been considered for the diagnosis of toxoplasmosis. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) uses inner and outer primer pairs designed to recognize six regions on the target allowing the formation of loop regions and a *Bst* DNA polymerase with strand displacement activity. The entire amplification is performed at a constant temperature (around 65°C), and detection can then be easily done by turbidimetry or fluorescence [140]. This method is rapid (the amplification and detection can be completed in 1 h or less), affordable and highly specific. It was first investigated to detect *T. gondii* DNA in environmental or veterinary samples, with encouraging results [141–143]. The first study on human blood samples was performed in 2010 and compared three LAMP assays targeting *SAG1*, *SAG2* and *B1* to a nested-PCR targeting the *B1* gene. The authors concluded to a better sensitivity of the three LAMP assays vs the nested PCR [144]. In 2014, Fallahi *et al.* came to the same conclusion by comparing LAMP and nested PCR targeting *rep529* and *B1* to detect *T. gondii* DNA from 110 blood samples of children with leukemia [145]. Sun *et al.* compared a LAMP and a cnPCR targeting *rep529* and found that the LAMP assay was more sensitive to detect *T. gondii* from blood samples of volunteer pregnant women [146]. A recent study comparing the sensitivity of a LAMP and a qPCR assay, however, showed a better sensitivity from the qPCR [147]. Further studies are therefore necessary to define the positioning of this technique in the molecular diagnosis of toxoplasmosis, but it seems promising and could facilitate the development of point-of-care testing or the implementation of molecular diagnosis of toxoplasmosis in low-income countries.

3.5. Commercial molecular assays

A growing number of commercial techniques are now available for the diagnosis of *T. gondii* infection. These techniques may enable the standardization of this analysis and also facilitate laboratory quality systems management procedures. The methods presented below all target the *rep529* sequence and have been evaluated and compared to methods commonly used by specialized laboratories. Morelle *et al.* evaluated the nested-PCR AMS94/F assay (Clonit, Milan, Italy), and they concluded that the marketed method was less sensitive than the laboratory-developed cnPCR and qPCR on spiked samples and AF [137]. The *Toxoplasma* ELITE MGB assay (Elitech, Puteaux, France) was compared with three in-house qPCR assays in use in proficient laboratories. This evaluation revealed that this commercial method tended to be less sensitive than the reference assays on low parasite load samples but showed satisfactory performance with 100% specificity and sensitivity results ranging from 79% and 100% depending on the nature of clinical sample [148]. The Bio-Evolution qPCR assay (Bussy-Saint-Martin, France) was evaluated in a multicentric study which compared its performances to those of eight laboratory-developed techniques on 157 AF samples mostly retrospectively selected in biobanks, 76 of which were positive. All assays were 86% sensitive and 100% specific [149]. Ammar *et al.* recently evaluated the same commercial assay on samples from immunocompromised patients (blood, CSF, BALF and miscellaneous samples) and found a good agreement with *rep529*-targeting in-house qPCR and a sensitivity and a specificity of 98.8% and 100% respectively [150]. Varlet-Marie *et al.* recently evaluated the *lam* TOXO Q-LAMP method developed by Diasorin (Saluggia, Italy) and based on the LAMP technique. The qualitative results were in accordance with those obtained by the in-house qPCR, from negative or spiked AF and plasma, and from clinical samples [111]. Finally, The TibMolBiol qPCR assay (TIB MolBiol GmbH, Berlin, Germany) was evaluated on different matrices and showed good performance [151].

It should be noted that the TibMolBiol and the Progenie Molecular (Valencia, Spain) assays are also being evaluated by the French National Reference Center for Toxoplasmosis.

To our knowledge, the Clonit and the Diasorin assays presented above are no longer commercially available. The properties of the four remaining assays are summarized in Table 3.

4. Conclusion

Since its introduction in the 1980s, molecular methods has played a major role in the diagnosis of *T. gondii* infection, gradually replacing the previous, less rapid and less sensitive gold standard in the diagnostic algorithms for almost every clinical situations related to *T. gondii*. Molecular techniques enables the prompt diagnosis and regular monitoring of at-risk patients, resulting in earlier treatment and improved prognosis. Significant progress has been made to improve practices, but except for the choice of the target sequence *rep529*, which now represents a consensus, there are substantial divergences between the protocols in use, particularly in terms of extraction or amplification methods. Beyond the choice of sub-processes, each step of the entire molecular detection

process must be optimized and adapted in order to improve the performance and achieve detection thresholds that are low enough to meet the potentially low parasitic loads in clinical samples. The growing number of commercially available methods could facilitate the much-needed standardization, but not all techniques are equal, and it is essential to correctly evaluate them before their implementation in medical diagnostic laboratories.

5. Expert opinion

Molecular methods now play an essential role in the diagnosis of *T. gondii* infection, particularly in critical situations such as disseminated toxoplasmosis in immunocompromised patients or congenital infections. However, this approach has long been neglected by manufacturers, leading academic laboratories to develop their own in-house assays. This has come at the price of a wide variety of practices applied at all stages of the molecular diagnostics process. From sample pre-treatment to extraction, from the choice of primers to that of the amplification and detection method and from the use of controls to the choice of the number of analyses per sample, practices vary considerably. This heterogeneity results in variable performance from one laboratory to another. In an attempt to harmonize practices, the French National Reference Center for Toxoplasmosis has recently proposed technical recommendations for good practice [102]. The latter concern (i) the preferential use of qPCR over cnPCR, (ii) the use of the *rep529* target, (iii) the use of PCR primers and methods which have proven value in robust multisite studies, (iv) at least the duplicate analysis of each clinical sample, (v) the use of an extraction control, (vi) the use of an inhibition control bearing the same primer sequences as the pathogen's DNA target [109], (vii) physical separation of DNA preparation, reagent solution preparation and amplification rooms with respect for the flow direction from extraction to amplification, (viii) at least one negative control reaction(s) in each PCR run, and finally (ix) the use of Uracil-DNA glycosylase to avoid carry-over contaminations. Beyond the use of these good practices, the proficiency of the laboratories and the optimization of their techniques are essential to ensure proper performance. Indeed, Sterkers *et al.* have shown that differences in performance between techniques do not only rely on the choice of primers or the amplification method [129]. The definition of international standards for this analysis, as can be the case for other pathogens (e.g. HBV or HAV) is also essential to allow a homogeneous calibration of the different techniques.

The syndromic approach is a recent advancement in the molecular diagnosis of infectious diseases. It is based on the simultaneous detection of several pathogens that may potentially be involved in a clinical situation, and thus theoretically allows for earlier diagnosis and treatment. At this time, probably because of the great variability of clinical presentations and clinical contexts as well as the diversity of matrices that can be used according to these different contexts, no existing panel allows the detection of *T. gondii*. However, such an approach could be attractive, especially in immunocompromised patients for whom the clinical presentation of

Table 3. Non-exhaustive list of marketed qPCR methods targeting *rep529*.

Marketed method	Validated clinical matrices	Internal control	Positive control	Extraction method	PCR instrument	Technology	CE-IVD	LoD (indicated by the manufacturer)	Se	Spe	Reference
<i>Toxoplasma gondii</i> BE-A997-AB and BE-A997-CD (Bio-Evolution, Bussy-Saint-Martin, France)	Whole blood, CSF, AF, BALF, biopsy (placenta)	Yes	Provided	Not specified	ABI Prism 7500; RotorGene Series; LightCycler 480; SmartCycler II; CFX96™	Hydrolysis probes	Yes	0,008 copies/μL	99% 99%	99% 100%	Manufacturer Ammar <i>et al.</i> , 2019 [150] (samples from immuno-compromised patients) Filisetti <i>et al.</i> , 2015 [149] (AF) /
TGON-U and TGON-G (Progenie Molecular, Valencia, Spain)	AF, plasma, serum, culture	Yes (Competitive Heterologous Internal Control)	Provided	Not specified	Not specified	Hydrolysis probes (Taqman)	No	10 copies/μL	/	/	/
LightMix Kit <i>Toxoplasma gondii</i> (TIB MolBiol GmbH, Berlin, Germany) LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) required but not provided	Not specified (DNA extract)	Yes (to be added during DNA isolation procedure)	Spiked extraction control (sEC)	Not specified	LightCycler 1.x/2.0/480 Instruments; Cobas z 480	Hybridization probes (FRET)	No	10 copies/reaction	100%	96.80%	Döşkaya <i>et al.</i> , 2019 [151]
<i>Toxoplasma g.</i> ELITe MGB Kit (Elitech, Puteaux, France)	Whole blood, AF, CSF	Required but supplied separately	Required but supplied separately	Manual (EXTRAblood) or automated: ELITe InGenius, or NucliSENS easy MAG	ABI 7300 Real-Time PCR system; ABI 7500 series	Minor Groove Binder (MGB) technology	Yes	11, 5, 7 parasites/ml (whole blood, AF, CSF)	97.7% 79– 100%	99.3% 100%	Manufacturer Robert-Gangneux <i>et al.</i> , 2017 [148]
<i>Toxoplasma gondii</i> Real-TM (Sacace Biotechnologies, Como, Italy)	Whole blood, cord blood, buffy coat, biopsy and autopsy material, CSF, AF	Yes (to be added during DNA isolation procedure)	Provided	Any commercial CE-IVD RNA/DNA isolation kit	Not specified	Hybridization probes	Yes	400 copies/ml	/	/	/

Footnote: qPCR: quantitative PCR; CE-IVD: CE mark certifying that the product fulfills the requirements set out in the EU directives for In-Vitro Diagnostic Medical Devices; LoD: limit of detection; Se: sensitivity; Spe: specificity; CSF: cerebro-spinal fluid; AF: amniotic fluid; BALF: broncho-alveolar lavage fluid; FRET: fluorescence resonance energy transfer.

toxoplasmosis may be nonspecific, and several infectious etiologies can be considered.

Recent years have also seen the development of fully integrated automated molecular platforms. These solutions are interesting and should be considered for the molecular diagnosis of *T. gondii* infection because they minimize manual operations and allow standardization and technical time saving. Nevertheless, it will be necessary to verify the performance of these solutions on all potential matrices prior to their deployment.

Despite its unfavorable prognosis in immunocompromised patients, molecular diagnostic techniques for toxoplasmosis are not currently adapted to emergency diagnosis and are generally performed in batches. The implementation of this diagnosis within syndromic panels, the use of fully integrated platforms from sampling to result and the development of unitary tests should be envisaged as solutions to this problem.

The present review focused on the molecular detection of *T. gondii* in biological samples; molecular methods for genotyping clinical strains either by PCR-restriction fragment length polymorphism, multilocus sequence typing or microsatellite markers have been deliberately omitted here. However, knowing that the genotype can have clinical repercussions, an integrated approach allowing the diagnosis and the systematic genotyping of the strains should be considered in the future to improve the understanding of the epidemiology and the evaluation of the risk of severe forms [152].

Much advancements remain to be made in the molecular diagnosis of *T. gondii* infection. Although many of these advances will be over the longer term, within the next 5 years, we can expect to see a harmonization of practices, particularly as a result of the work conducted by the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Automation should also be more widely used for extraction, and the implementation of the molecular diagnosis of toxoplasmosis on fully integrated platform should accelerate as the use of these platforms simplifies daily practice and workflow in medical laboratories.

Acknowledgments

The authors especially thank Dr Yvon Sterkers and Pr Patrick Bastien (Molecular Biology “Pole” of the French National Reference Center for Toxoplasmosis) for their constructive and helpful review of this manuscript.

Authors' contributions

All authors have contributed to the conception and design of the review article and have been involved in writing the review article and/or revised it for intellectual content.

Funding

This paper was not funded.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Reviewer disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. C R Seances Acad Sci. 1909;148:369–372.
2. Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. CRC Press; 2016.
3. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol. 2009;39:1385–1394.
4. Rostami A, Riahi SM, Gamble HR, et al. Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2020;26:673–683.
5. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363:1965–1976.
6. Fernández-Sabé N, Cervera C, Fariñas MC, et al. Risk Factors, Clinical Features, and Outcomes of Toxoplasmosis in Solid-Organ Transplant Recipients: a Matched Case-Control Study. Clin Infect Dis. 2012;54:355–361.
7. Su C, Khan A, Zhou P, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. PNAS. 2012;109:5844–5849.
8. Shwab EK, Zhu X-Q, Majumdar D, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. Parasitology. 2014;141:453–461.
9. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012;25:264–296.
- This review provides detailed information on all aspects of toxoplasmosis.
10. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. Am J Ophthalmol. 1992;114:136–144.
11. Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J Clin Microbiol. 2002;40:4037–4044.
12. Martino R, Maertens J, Bretagne S, et al. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2000;31:1188–1194.
13. Dunn D, Wallon M, Peyron F, et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. Lancet. 1999;353:1829–1833.
14. Wallon M, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: a plea for a neglected disease. Pathogens. 2018;7:25.
15. The SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) study group. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. Lancet. 2007;369:115–122.
16. Wallon M, Liou C, Garner P, et al. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. BMJ. 1999;318:1511–1514.
17. Hotop A, Hlobil H, Groß U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary toxoplasma gondii infection during pregnancy. Clin Infect Dis. 2012;54:1545–1552.

18. Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, et al. Prenatal Treatment for Serious Neurological Sequelae of Congenital Toxoplasmosis: an Observational Prospective Cohort Study. *PLoS Med.* **2010**;7:e1000351.
19. Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, et al. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends Parasitol.* **2016**;32:492–506.
20. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* **1989**;27:1787–1792.
21. Murat J-B, Fricker Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, et al. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2013**;11:943–956.
22. Villena I, Ancelle T, Delmas C, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Eurosurveillance.* **2010**;15(25):19600.
23. Prusa A-R, Kasper DC, Olischar M, et al. Evaluation of serological prenatal screening to detect *Toxoplasma gondii* infections in Austria. *NEO.* **2013**;103:27–34.
24. Fanigliulo D, Marchi S, Montomoli E, et al. *Toxoplasma gondii* in women of childbearing age and during pregnancy: seroprevalence study in Central and Southern Italy from 2013 to 2017. *Parasite.* **2020**;27:2.
25. Peyron F, L'ollivier C, Mandelbrot L, et al. Maternal and congenital toxoplasmosis: diagnosis and treatment recommendations of a French multidisciplinary working group. *Pathogens.* **2019**;8:24.
26. Hohlfield P, Daffos F, Costa J-M, et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *NEJM.* **1994**;331:695–699.
27. Costa J-M, Ernault P, Gautier E, et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Prenat Diagn.* **2001**;21:85–88.
28. Romand S, Chosson M, Franck J, et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol.* **2004**;190:797–802.
29. Yamamoto L, Targa LS, Sumita LM, et al. Association of parasite load levels in amniotic fluid with clinical outcome in congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol.* **2017**;130:335–345.
30. Kaiser K, Van Loon AM, Pelloux H, et al. Multicenter proficiency study for detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid by nucleic acid amplification methods. *Clin Chim Acta.* **2007**;375:99–103.
31. Sterkers Y, Pratlong F, Albaba S, et al. Novel Interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at the time of maternal infection. *J Clin Microbiol.* **2012**;50:3944–3951.
32. Wallon M, Franck J, Thulliez P, et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Obstet Gynecol.* **2010**;115:727–733.
33. Teixeira LE, Kanunfre KA, Shimokawa PT, et al. The performance of four molecular methods for the laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis in amniotic fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop.* **2013**;46:584–588.
34. Prusa A-R, Kasper DC, Pollak A, et al. Amniocentesis for the detection of congenital toxoplasmosis: results from the nationwide Austrian prenatal screening program. *Clin Microbiol Infect.* **2015**;21:191.e1–191.e8.
35. de Oliveira Azevedo CT, do Brasil PE, Guida L, et al. Performance of polymerase chain reaction analysis of the amniotic fluid of pregnant women for diagnosis of congenital toxoplasmosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* **2016**;11:e0149938.
36. Tóth T, Sziller I, Papp Z. PCR detection of *Toxoplasma gondii* in human fetal tissues. In: Meltzer SJ, editor. *PCR in Bioanalysis*. Totowa, NJ: Humana Press; **1998**.
37. Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, et al. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* **2010**;29:33–38.
38. Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, et al. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **1996**;15:799–805.
39. Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Schaal J-P, et al. Value of *Toxoplasma gondii* detection in one hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* **2007**;26:845–846.
40. Filisetti D, Cocquerelle V, Pfaff A, et al. Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* **2010**;29:665–667.
41. Filisetti D, Yera H, Villard O, et al. Contribution of Neonatal Amniotic Fluid Testing to Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* **2015**;53:1719–1721.
42. Peyron F, McLeod R, Ajzenberg D, et al. Congenital toxoplasmosis in France and the United States: one parasite, two diverging approaches. *PLoS Negl Trop Dis.* **2017**;11(2):e0005222.
43. Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2011**;71:174–176.
44. Olariu TR, Remington JS, Montoya JG. Polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* **2014**;33:566–570.
45. Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, et al. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol.* **1996**;34:2368–2371.
46. Loveridge-Easther C, Yardley AM, Breidenstein B. Use of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J AAPOS.* **2018**;22:239–240.
47. Vidal JE. HIV-related cerebral toxoplasmosis revisited: current concepts and controversies of an old disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care.* **2019**;18:2325958219867315.
48. Robert-Gangneux F, Meroni V, Dupont D, et al. Toxoplasmosis in transplant recipients, Europe, 2010–2014. *Emerg Infect Dis.* **2018**;24:1497–1504.
49. Robert-Gangneux F, Belaz S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* **2016**;29:330–339.
50. Parmley SF, Goebel FD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* **1992**;30:3000–3002.
51. Schoondermark-van de Ven E, Galama J, Kraaijeveld C, et al. Value of the polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* **1993**;16:661–666.
52. Novati R, Castagna A, Morsica G, et al. Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. *AIDS.* **1994**;8:1691–1694.
53. Khalifa KE-S, Roth A, Roth B, et al. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* **1994**;32:2813–2819.
54. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol.* **1995**;33:2421–2426.
55. Eggers C, Groß U, Klinker H, et al. Limited value of cerebrospinal fluid for direct detection of *Toxoplasma gondii* in toxoplasmic encephalitis associated with AIDS. *J Neurol.* **1995**;242:644–649.
56. Cingolani A, De Luca A, Ammassari A, et al. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *J Med Microbiol.* **1996**;45:472–476.
57. Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira ACP, et al. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol.* **2004**;42:4765–4768.
58. Nogui FLN, Mattas S, Turcato Júnior G, et al. Neurotoxoplasmosis diagnosis for HIV-1 patients by real-time PCR of cerebrospinal fluid. *Braz J Infect Dis.* **2009**;13:18–23.

59. Correia CC, Melo HRL, Costa VMA. Influence of neurotoxoplasmosis characteristics on real-time PCR sensitivity among AIDS patients in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104:24–28.
60. Alfonso Y, Fraga J, Cox R, et al. Conventional polymerase chain reaction for the diagnosis of neurotoxoplasmosis: comparison of three sets of primers for the *B1* gene using CSF samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:150–154.
61. Mikita K, Maeda T, Ono T, et al. The utility of cerebrospinal fluid for the molecular diagnosis of toxoplasmic encephalitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:155–159.
62. Sakamoto N. Clinical presentation and diagnosis of toxoplasmic encephalitis in Japan. *Parasitol Int.* 2014;63:701–704.
63. Anselmo L, Vilar F, Lima J, et al. Usefulness and limitations of polymerase chain reaction in the etiologic diagnosis of neurotoxoplasmosis in immunocompromised patients. *J Neurol Sci.* 2014;346:231–234.
64. Dard C, Marty P, Brenier-Pinchart M-P, et al. Management of toxoplasmosis in transplant recipients: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16:447–460.
- In this review, the specific features of toxoplasmosis in transplant patients regarding diagnosis or treatment are discussed by the authors
65. Hakko E, Ozkan HA, Karaman K, et al. Analysis of cerebral toxoplasmosis in a series of 170 allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 2013;15:575–580.
66. Dupouy-Camet J, de Souza SL, Maslo C, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1866–1869.
67. Lamoril J, Molina JM, De Gouvello A, et al. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol.* 1996;49:89–92.
68. Franzen C, Altfeld M, Hegener P, et al. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2639–2641.
69. Colombo FA, Vidal JE, de Oliveira ACP, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5044–5047.
70. Cardona N, Basto N, Parra B, et al. Detection of *Toxoplasma* DNA in the peripheral blood of HIV-positive patients with neuro-opportunistic infections by a real-time PCR Assay. *J Neuroparasitology.* 2011;2:1–6.
71. Ajzenberg D, Lamaury I, Demar M, et al. 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;10(6):e0004790.
72. Ajzenberg D. Is PCR testing on blood samples useful or not in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104:569–570.
73. Botterel F, Ichai P, Feray C, et al. Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1648–1650.
74. Zimmermann S, Hadaschik E, Dalpke A, et al. Varicella-Like cutaneous toxoplasmosis in a patient with aplastic anemia. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1341–1344.
75. Desoubreux G, É C, Franck-Martel C, et al. Pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients with interstitial pneumonia: a single-centre prospective study assessing PCR-based diagnosis. *J Clin Pathol.* 2016;69:726–730.
76. Bretagne S, Costa J-M, Foulet F, et al. Prospective study of *Toxoplasma* reactivation by polymerase chain reaction in allogeneic stem-cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2000;2:127–132.
77. Martino R, Bretagne S, Einsele H, et al. Early Detection of *Toxoplasma* Infection by Molecular Monitoring of *Toxoplasma gondii* in Peripheral Blood Samples after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis.* 2005;40:67–78.
78. Edvinsson B, Lundquist J, Ljungman P, et al. A prospective study of diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection after bone marrow transplantation. *APMIS.* 2008;116:345–351.
79. Fricker-Hidalgo H, Bulabois C-E, Brenier-Pinchart M-P, et al. Diagnosis of Toxoplasmosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: results of DNA Detection and Serological Techniques. *Clin Infect Dis.* 2009;48:e9–e15.
80. Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:1089–1101.
81. Gajurel K, Dhakal R, Montoya JG. Toxoplasma prophylaxis in hematopoietic cell transplant recipients: a review of the literature and recommendations. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(4):283–292.
82. Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, et al. Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis in Immunocompromised Patients: a 3-Year Multicenter Retrospective Study. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1677–1684.
- This study provides recent epidemiological data and highlights the positive impact of the PCR follow-up of at-risk patients.
83. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. *Am J Ophthalmol.* 2003;136:973–988.
84. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a 50th Anniversary Tribute to the Contributions of Helenor Campbell Wilder Foerster. *Arch Ophthalmol.* 2002;120:1081–1084.
85. Garweg JG, de Groot-Mijnes JDF, Montoya JG. Diagnostic approach to ocular toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011;19:255–261.
- The authors propose a diagnostic algorithm for ocular toxoplasmosis
86. Greigert V, Foggia ED, Filisetti D, et al. When biology supports clinical diagnosis: review of techniques to diagnose ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol.* 2019;103:1008–1012.
87. Bourdin C, Busse A, Kouamou E, et al. PCR-based detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood and ocular samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3987–3991.
88. Greigert V, Pfaff AW, Sauer A, et al. Biological diagnosis of ocular toxoplasmosis: a nine-year retrospective observational study. *mSphere.* 2019;4:e00636–19.
- This study highlights the fact that the diagnosis of atypical ocular toxoplasmosis requires the combination of different diagnostic tools.
89. Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, et al. Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1965–1967.
90. Talabani H, Asseraf M, Yera H, et al. Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2131–2135.
91. Bou GN, Figueroa MS, Marti-Belda P, et al. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3465–3468.
92. Contini C, Seraceni S, Cultrera R, et al. Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *Int J Parasitol.* 2005;35:275–283.
93. De Salvador-Guillouët F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, et al. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. *J Infect.* 2006;53:e47–e50.
94. Bossi P, Paris L, Caumes E, et al. Severe acute disseminated toxoplasmosis acquired by an Immunocompetent patient in French Guiana. *Scand J Infect Dis.* 2002;34:311–314.
95. Henao-Martínez AF, Franco-Paredes C, Palestine AG, et al. Symptomatic acute toxoplasmosis in returning travelers. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5:1–3.
96. Sobanski V, Ajzenberg D, Delhaes L, et al. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:1143–1145.

97. Demar M, Hommel D, Djossou F, et al. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E221–E231.
98. Leal FE, Cavazzana CL, de Andrade HF, et al. *Toxoplasma gondii* pneumonia in immunocompetent subjects: case report and review. *Clin Infect Dis.* 2007;44:e62–e66.
99. Lévêque MF, Chiffre D, Galtier C, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis at the onset of symptomatic primary infection: a straightforward alternative to serological examinations. *Int J Infect Dis.* 2019;79:131–133.
100. Pustorino G, Ferlazzo E, Carpentieri MS, et al. Cerebral toxoplasmosis diagnosed by brain tissue PCR analysis in an immunocompetent patient. *Neurol Clin Pract.* 2017;7:436–438.
101. Brenier-Pinchart M-P, Varlet-Marie E, Robert-Gangneux F, et al. Impact of pre-analytic step duration on molecular diagnosis of toxoplasmosis for five types of biological samples. *PLoS One.* 2021;16(2):e0246802.
102. Roux G, Varlet-Marie E, Bastien P, et al. Evolution of *Toxoplasma*-PCR methods and practices: a French national survey and proposal for technical guidelines. *Int J Parasitol.* 2018;48:701–707.
- In this article, the authors analyzed the diversity of practices in molecular diagnosis of toxoplasmosis in French laboratories, and propose technical recommendations concerning the different aspects of this diagnosis.
103. Menotti J, Garin YJ-F, Thulliez P, et al. Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:363–368.
104. Cassaing S, Bessi eres MH, Berry A, et al. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2006;44:720–724.
105. Reischl U, Bretagne S, Kr ger D, et al. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis.* 2003;3:7.
- Description of a still widely used qPCR protocol targeting *rep529* and first evidence in favor of the superiority of this target.
106. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa A-R, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63:10–15.
107. Belaz S, Gangneux J-P, Dupretz P, et al. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1294–1300.
108. Delhaes L, Yera H, Ache S, et al. Contribution of molecular diagnosis to congenital toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76:244–247.
109. Roux G, Ravel C, Varlet-Marie E, et al. Inhibition of polymerase chain reaction: pathogen-specific controls are better than human gene amplification. *PLoS One.* 2019;14:e0219276.
110. Menotti J, Vilela G, Romand S, et al. Comparison of PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5313–5316.
111. Varlet-Marie E, Sterkers Y, Perrotte M, et al. A new LAMP-based assay for the molecular diagnosis of toxoplasmosis: comparison with a proficient PCR assay. *Int J Parasitol.* 2018;48:457–462.
112. Brenier-Pinchart M-P, Capderou E, Bertini R-L, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the detection of circulating *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82:289–291.
113. Tomasoni LR, Meroni V, Bonfanti C, et al. Multidisciplinary approach to congenital *Toxoplasma* infection: an Italian nationwide survey. *New Microbiol.* 2014;37:347–354.
114. Yera H, Filisetti D, Bastien P, et al. Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for *Toxoplasma* DNA extraction from amniotic fluid. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3881–3886.
115. Zhao F, Bulin L, Fricker-Hidalgo H, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: evaluation of automated DNA extraction using eMAG® (bioMérieux) on buffy coat, cerebrospinal and bronchoalveolar lavage fluids. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58:e91–e93.
116. Faucher B, Miermont F, Ranque S, et al. Optimization of *Toxoplasma gondii* DNA extraction from amniotic fluid using NucliSENS easyMAG and comparison with QIAamp DNA minikit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:1035–1039.
117. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, et al. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1988;141:3584–3591.
118. Cazenave J, Cheyrou A, Blouin P, et al. Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma*. *J Clin Pathol.* 1991;44:1037.
119. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000;30:69–75.
- First use of the *rep529* sequence as a target for the molecular diagnosis of toxoplasmosis.
120. Cristina N, Derouin F, Pelloux H, et al. [Detection of *Toxoplasma gondii* by “Polymerase Chain Reaction” (PCR) technique in AIDS infected patients using the repetitive sequence TGR1E]. *Pathol Biol.* 1992;40:52–55.
121. Costa JM, Dard  ML, Assouline B, et al. Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2542–2545.
122. Feng XC, Milhausen M. Localization of *Toxoplasma gondii* in feline intestinal tissue using PCR. *J Parasitol.* 1999;85:1041–1046.
123. Bretagne S, Costa JM, Vidaud M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *J Infect Dis.* 1993;168:1585–1588.
124. Lin M-H, Chen T-C, Kuo T, et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4121–4125.
125. Jalal S, Nord CE, Lappalainen M, et al. Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:937–939.
126. Pelloux H, Weiss J, Simon J, et al. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett.* 1996;138:11–15.
127. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Marty P, et al. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1594–1602.
128. Wahab T, Edvinsson B, Palm D, et al. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 2010;48:591–592.
129. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, et al. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3216–3222.
130. Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, et al. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in S o Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics.* 2009;64:171–176.
131. Camilo LM, Pereira-Chiocola VL, Gava R, et al. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in S o Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2017;21:638–647.
132. Pomares C, Estran R, Press CJ, et al. Is real-time PCR targeting rep 529 suitable for diagnosis of toxoplasmosis in patients infected with non-type II strains in North America? *J Clin Microbiol.* 2020;58:e01223–19.
133. Maubon D, M-p B-P, Fricker-Hidalgo H, et al. Apport de la PCR quantitative dans le diagnostic de la toxoplasmose: la voie de la standardisation? [Real-time PCR in the diagnosis of toxoplasmosis: the way to standardisation?]. *Pathol Biol.* 2007;55:304–311.
134. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol.* 2017;8:108.

135. Nagy B, Bán Z, Beke A, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. *Clin Chim Acta*. 2006;368:131–137.
136. Torres E, Rivera R, Cardona N, et al. Evaluation of IgG anti-*Toxoplasma* avidity and polymerase chain reaction in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:693–695.
137. Morelle C, Varlet-Marie E, Brenier-Pinchart M-P, et al. Comparative assessment of a commercial kit and two laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3977–3982.
138. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “Conventional” PCR. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1897–1900.
139. Varlet-Marie E, Sterkers Y, Brenier-Pinchart M-P, et al. Characterization and multicentric validation of a common standard for *Toxoplasma gondii* detection using nucleic acid amplification assays. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3952–3959.
140. Notomi T, Mori Y, Tomita N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*. 2015;53:1–5.
141. Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62:357–365.
142. Zhang H, Thekisoe OMM, Aboge GO, et al. *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Exp Parasitol*. 2009;122:47–50.
143. Krasteva D, Toubiana M, Hartati S, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. *Vet Parasitol*. 2009;162:327–331.
144. Lau YL, Meganathan P, Sonaimuthu P, et al. Specific, Sensitive, and Rapid Diagnosis of Active Toxoplasmosis by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Using Blood Samples from Patients. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3698–3702.
145. Fallahi S, Seyyed Tabaei SJ, Pournia Y, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and nested-PCR assay targeting the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* in blood samples of children with leukaemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79:347–354.
146. Sun X, Ji Y, Liu X, et al. Improvement and evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Toxoplasma gondii* infection in human blood samples. *PLoS One*. 2017;12:e0169125.
147. Soltani Tehrani B, Mirzajani E, Fallahi S, et al. Challenging TaqMan probe-based real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the two sensitive molecular techniques for the detection of toxoplasmosis, a potentially dangerous opportunistic infection in immunocompromised patients. *Arch Microbiol*. 2020;202:1881–1888.
148. Robert-Gangneux F, Brenier-Pinchart M-P, Yera H, et al. Evaluation of *Toxoplasma* ELITE MGB real-time PCR assay for diagnosis of Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1369–1376.
149. Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart M-P, et al. Multicentric comparative assessment of the bio-evolution *Toxoplasma gondii* detection kit with eight laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2015;53:29–34.
150. Ammar NA, Yera H, Bigot J, et al. Multicentric evaluation of the bio-evolution *Toxoplasma gondii* assay for the detection of *Toxoplasma* DNA in Immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*. 2019;58:e01231.
151. Döşkaya M, Pullukçu H, Karakavuk M, et al. Comparison of an in house and a commercial real-time polymerase chain reaction targeting *Toxoplasma gondii* RE gene using various samples collected from patients in Turkey. *BMC Infect Dis*. 2019;19:1042.
152. Su C, Shwab EK, Zhou P, et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2010;137:1–11.

2. SEROLOGIE

La sérologie constitue l'une des principales méthodes de diagnostic de la toxoplasmose. Elle consiste à détecter les anticorps dirigés contre *T. gondii* et s'appuie sur la cinétique de la réponse humorale pour pouvoir déterminer le statut immunitaire, dater l'infection, et joue un rôle clé dans différentes situations cliniques ainsi que dans les études épidémiologiques (Dard et al., 2016).

1. CINÉTIQUE DES ANTICORPS

Suite à l'infection par *T. gondii*, les différents isotypes d'anticorps apparaissent de façon séquentielle (**Figure 21**). Ainsi la détection et la détermination des taux des IgG et des IgM permet d'identifier les sujets séropositifs et séronégatifs. La recherche d'IgA et d'IgE peut également s'avérer utile dans certaines situations.

Les IgM et les IgA apparaissent habituellement dès la première semaine post-infection, pour atteindre un plateau après environ 1 mois, avant de décroître progressivement pour devenir négatives dans la majorité des cas après plusieurs mois (Fricker-Hidalgo et al., 2020; Robert-Gangneux & Dardé, 2012). La détection d'IgM est donc habituellement associée à une infection récente, mais les IgM peuvent persister parfois même plusieurs années post-infection et de rares séroconversions sans IgM ont pu être décrites dans la littérature, ce qui limite l'intérêt de ce critère pour discriminer avec certitude infection récente et ancienne (Bobic et al., 1991; Fricker-Hidalgo et al., 2013; Gras et al., 2004). Le recours à des techniques complémentaires spécialisées et l'étude de la cinétique des anticorps sur plusieurs sérums consécutifs sont donc nécessaires pour dater précisément une infection. Cette datation est indispensable chez la femme enceinte puisqu'une primo-infection au cours de la grossesse fait courir le risque d'infection congénitale du fœtus.

En fonction de la technique utilisée, les IgG apparaissent entre une et 3 semaines après l'apparition des IgM et augmentent rapidement jusqu'à atteindre un plateau en 2 à 3 mois, puis décroissent progressivement, mais se maintiennent ensuite à des taux résiduels (Dard et al., 2016; Fricker-Hidalgo et al., 2020). Si la persistance à vie des IgG a longtemps été considérée comme un dogme, certaines données suggèrent cependant qu'ils peuvent devenir indétectables au cours de l'existence (Burrells et al., 2016; Rougier et al., 2017). Pour exemple, une étude de séroprévalence menée sur une période de 5 ans chez des donneurs de sang en Ecosse avec les mêmes techniques a montré que le taux de conversion d'une sérologie positive à une sérologie négative était 3 fois supérieur au taux de séroconversion (Burrells et al., 2016). Par ailleurs, la diminution et la négativation des titres d'IgG et de la réponse

immunitaire cellulaire a récemment été démontrée chez certains sujets adultes congénitalement infectés (Rougier et al., 2017).

La résume la cinétique des anticorps classiquement observée après l'infection par *T. gondii*.

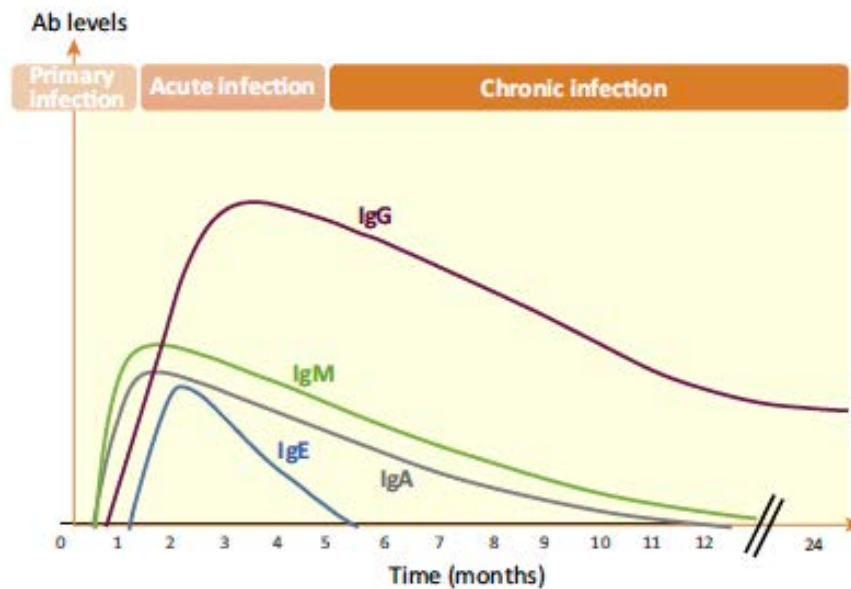


Figure 21. Cinétique des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* après une primo-infection.

Figure issue de Dard et al., 2016 (Dard et al., 2016).

2. TECHNIQUES

Différentes techniques sérologiques peuvent être mises en œuvre pour détecter ou quantifier les anticorps dirigés contre *T. gondii*. Les principales techniques sont brièvement présentées ci-dessous.

a) Dye test

Le dye test est le premier test sérologique développé pour détecter la présence d'anticorps anti-*Toxoplasma* (Sabin & Feldman, 1948). Il détecte l'ensemble des isotypes circulants, et utilise comme source antigénique une suspension de tachyzoïtes vivants qui sont incubés avec une source de complément (sérum humain sans anticorps) et la dilution du sérum du patient décomplémenté, puis colorés au bleu de méthylène. La lecture au microscope permet d'identifier les parasites non altérés (réfringents ou colorés) ou lysés par le complément du fait de la présence d'anticorps dans le sérum du patient (grisâtres). La dilution du sérum permettant la lyse de 50% des parasites correspond au titre d'anticorps (Sabin & Feldman, 1948).

Cette méthode a longtemps été considérée comme la référence en termes de sérodiagnostic de la toxoplasmose du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais

les difficultés d'utilisation – et notamment le maintien d'une source de toxoplasmes vivants en culture *in vivo* ou *in vitro*, avec les risques que cela comporte pour le personnel de laboratoire, ou encore le recours à une source de complément -, ainsi que le développement de techniques moins exigeantes, restreignent désormais son utilisation à de rares laboratoires spécialisés (Reiter-Owona et al., 1999).

b) Tests d'agglutination

La technique d'agglutination directe d'une suspension de toxoplasmes consiste à placer des tachyzoïtes de *T. gondii* formolés dans des plaques de micro-titration à fond en U et à ajouter les dilutions de sérums. La présence d'IgG anti-*Toxoplasma* entraîne la formation d'un voile d'agglutination homogène au fond des puits, tandis que les tachyzoïtes précipitent au fond en formant un bouton de sédimentation en l'absence d'anticorps spécifiques (Desmonts & Remington, 1980).

Une variante de ce test consiste à comparer les titres obtenus avec des tachyzoïtes fixés dans le formol (antigène F) à ceux obtenus avec des tachyzoïtes fixés dans l'acétone ou le méthanol (antigène AC). La préparation d'antigène AC est reconnue préférentiellement par les anticorps IgG de début de d'infection. Ainsi au cours de l'infection aiguë l'agglutination aura tendance à être similaire avec les deux préparations F et AC, mais au cours de l'infection chronique, les titres sont plus élevés avec l'antigène F qu'avec l'antigène AC (Dannemann et al., 1990).

Le test d'agglutination au latex (LAT) consiste à mettre en présence du sérum des particules de latex recouvertes d'antigènes de *T. gondii*. En présence d'anticorps anti-*Toxoplasma*, l'agglutination des particules est visible à l'œil nu (Mazumder et al., 1988). Le test d'hémagglutination fonctionne sur le même principe, mais utilise des hématies sensibilisées avec de l'antigène de *T. gondii* (L. Jacobs & Lunde, 1957).

L'*Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAgA) est une méthode basée sur l'immunocapture des IgM ou des IgA par des anticorps anti-immunoglobuline fixés au fond de puits sur microplaques, et sur la liaison ou non à une suspension de tachyzoïtes formolés. La présence d'anticorps anti-*Toxoplasma* dans le sérum se traduit comme avec la technique d'agglutination directe, par la formation d'un voile, alors que les parasites sédimentent en formant un bouton au fond du puits en l'absence d'anticorps (Desmonts et al., 1981).

c) Immunofluorescence indirecte

Les IgG ou les IgM peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte, en mettant en contact sur lame des tachyzoïtes formolés et les dilutions de sérum. Un

anticorps secondaire anti-IgG ou anti-IgM couplé à un fluorophore permet de révéler la présence d'anticorps anti-*Toxoplasma* dans le sérum (Kelen et al., 1962).

d) Western blot

Le western blot est également utilisé dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose. Les antigènes sont transférés après migration ou directement déposés sur membrane de nitrocellulose, puis sont reconnus par les anticorps présents dans le sérum, et un anticorps secondaire couplé à une enzyme permet de révéler la positivité. La source antigénique peut être de l'extrait total de tachyzoïtes ou un ou plusieurs antigènes recombinants. Au-delà de la simple détection d'anticorps, cette technique peut être utilisée pour comparer les profils sérologiques mère-enfant dans le cadre d'une suspicion de toxoplasmose congénitale, ou sérum-humeur aqueuse lorsqu'une toxoplasmose oculaire est évoquée (Dard et al., 2016).

e) Méthodes immuno-enzymatiques (EIA)

Introduite en 1976 dans le diagnostic de la toxoplasmose, l'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) est probablement l'une des techniques les plus répandues pour la détection des IgM et des IgG anti-*Toxoplasma* (Voller et al., 1976). La possibilité d'automatisation et le développement de nombreuses techniques commerciales s'appuyant sur ce principe ont contribué à son succès (Murat et al., 2013). La source antigénique (lysate de tachyzoïtes ou combinaison plus ou moins complexe d'antigènes recombinants) est fixée au fond de puits en microplaques, et peut être reconnue par les éventuels anticorps présents dans le sérum du patient. Après plusieurs lavages, un anticorps secondaire (anti-IgM ou anti-IgG) couplé à une enzyme est ajouté, suivi de son substrat, ce qui permet de révéler la liaison anticorps-antigène. Les techniques *enzyme-linked fluorescent assay* (ELFA) et *chemiluminescent immunoassay* (CLIA) se basent sur le même principe que l'ELISA mais la détection se fait par fluorescence et luminescence respectivement. Les cinétiques observées peuvent quelque peu varier en fonction des antigènes et des méthodes utilisées (Fricker-Hidalgo et al., 2020).

f) Avidité des IgG spécifiques

Les tests d'avidité s'appuient sur le fait que la force de la liaison entre les anticorps et les épitopes augmente avec la durée de l'infection (Hedman et al., 1989). Le rapport des titres entre deux tests réalisés avec et sans agent bloquant ou dénaturant (généralement de l'urée) permet d'évaluer la force de la liaison ou avidité : des titres similaires avec et sans dénaturant sont observés lorsque la liaison antigène-anticorps est forte, tandis que les titres sont plus faibles avec dénaturant lorsque la liaison est

faible. L'avidité est ainsi utilisée pour discriminer infection ancienne ou récente, une avidité élevée étant associée à une infection ancienne, alors qu'une avidité faible ou intermédiaire ne permet pas de conclure du fait de la persistance d'une avidité faible chez certains sujets (Fricker-Hidalgo et al., 2006, 2017; Garnaud et al., 2020). Si plusieurs techniques peuvent en principe être utilisées, c'est généralement sur le principe de l'ELISA que repose la détermination de l'avidité. Plusieurs techniques automatisées commerciales sont disponibles.

g) Limites

Malgré un panel considérable de techniques sérologiques disponibles, des difficultés diagnostiques persistent et il reste encore difficile de répondre précisément à certaines questions. Cela est particulièrement vrai en ce qui concerne la datation d'une séroconversion dans le cadre du suivi sérologique de la femme enceinte. Ce sont en effet les résultats sérologiques qui doivent permettre d'établir si la séroconversion s'est produite ou non au cours de la grossesse, ce qui conditionne la suite de la prise en charge. Les situations les plus complexes nécessitent l'analyse de plusieurs sérums prélevés à quelques semaines d'intervalle pour établir une cinétique des différents isotypes.

3. ANTIGENES

Au-delà de la technique, la source antigénique joue un rôle considérable dans les performances de la sérologie *T. gondii*. De nombreuses techniques commerciales et « maison » utilisent des antigènes natifs issus de tachyzoïtes cultivés *in vitro* ou *in vivo* et préparés selon des méthodes variables. En plus du risque biologique associé à la culture de *T. gondii*, cela peut générer des difficultés de standardisation et la présence d'impuretés propres à la méthode de production peut influencer sur le résultat (Holec-Gąsior, 2013). Le recours à des antigènes recombinants est donc une piste envisagée non seulement pour améliorer les performances et la précision du diagnostic mais également pour optimiser la standardisation des préparations antigéniques.

Plusieurs antigènes de surface (essentiellement SAG1 mais également SAG2 ou SRS3), protéines GRA, ROP ou MIC ont été évalués individuellement avec différentes techniques (**Tableau 4**). De grandes disparités sont observées entre les études, du fait de procédés de production différents (choix de séquences antigéniques, système d'expression...), mais aussi du fait de techniques considérées comme références plus ou moins adaptées à la définition des cas aigus ou chroniques. En dehors des études françaises, peu d'études s'appuient sur plus d'un sérum pour affirmer une

séroconversion récente (Golkar et al., 2007), et la seule présence d'IgM suffit dans la plupart des études, à définir une infection aiguë. Des difficultés sont également rencontrées avec la production d'antigènes recombinants, certaines protéines pouvant être difficiles à produire de façon efficace, et des défauts de repliement ont pu être mis en cause dans la diminution d'immunogénicité observée (Chen et al., 2001; Nigro et al., 2003). Néanmoins, il ressort de ces différentes études que certains antigènes comme les antigènes de surface du tachyzoïte SAG1, SRS3 ou SAG2, détectent aussi bien l'infection en phase aiguë que chronique, tandis que d'autres comme les GRA6, 7 et 8 ou ROP1 ont tendance à être plus précocement détectés, avec une sensibilité qui diminue au cours de l'infection chronique.

La combinaison de plusieurs antigènes recombinants a également été explorée afin d'améliorer les performances observées en termes de sensibilité et d'identification du stade de la maladie. Une récente revue de la littérature présente les différentes combinaisons qui ont pu être évaluées sous forme de mélanges ou de protéines chimériques multi-épitopes (R. H. D. Ybañez et al., 2020).

Certaines techniques commerciales utilisent des antigènes recombinants unitaires (généralement SAG1) ou en combinaison. Les plus utilisés sont SAG1, GRA7, GRA6, GRA8 ou encore ROP2 (Dard, 2018).

L'autre avantage qu'offre l'utilisation d'antigènes recombinants est la possibilité de cibler spécifiquement un stade parasitaire particulier en utilisant des marqueurs sérologiques spécifiques de stades. Les antigènes recombinants utilisés à l'heure actuelle dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose sont tous essentiellement exprimés au cours du stade tachyzoïte du parasite, à l'exception de MAG1 qui est plus exprimée dans le bradyzoïte que dans le tachyzoïte mais qui paradoxalement semble être un meilleur marqueur sérologique de l'infection aiguë que chronique (Holec et al., 2007, p. 1). Mais l'intérêt de certains antigènes spécifiques du sporozoïte et de l'oocyste a également été étudié à visée épidémiologique pour discriminer les infections via ingestion d'oocystes de celles induites par ingestion de kystes (Álvarez García et al., 2021; Crawford et al., 2010; Hill et al., 2011; X.-Y. Liu et al., 2019; Santana et al., 2015). En effet, il y a assez peu de certitudes concernant l'importance relative de l'infection par oocyste chez l'humain, mais elle est estimée en cause dans une large proportion des infections à travers le monde (Hald et al., 2016). Une meilleure compréhension des modes de contaminations prépondérants chez l'humain est nécessaire pour optimiser les stratégies de prévention.

Ainsi, la protéine sporo-SAG a initialement été proposée car idéalement localisée à la surface des sporozoïtes, mais l'étude de son immunogénicité chez l'humain et chez l'animal s'avère décevante (Crawford et al., 2010).

En 2011, la comparaison de western blots chargés d'une préparation de sporozoïtes et soumis à des sérums de porcs infectés par oocystes ou kystes, a permis de mettre en évidence la protéine ERP comme étant à la fois spécifique de l'oocyste et immunogène (Hill et al., 2011). Chez l'humain, la sérologie ERP s'est avérée positive dans une cohorte de personnels de laboratoire pour lesquels une infection par oocyste était prouvée, avec une apparition d'IgM et d'IgG anti-ERP dans le mois suivant l'infection et une persistance jusqu'à 8 mois post-infection. Le taux de positivité était également plus élevé dans une cohorte en lien avec un épisode épidémique dû à des oocystes de *T. gondii*, que dans une cohorte de séropositifs (Hill et al., 2011).

Plus récemment, la protéine CCp5A a également été mise en évidence du fait de sa réactivité différentielle chez l'animal. Chez l'humain, le taux de positivité était plus important dans une cohorte en lien avec un épisode épidémique causé par oocystes, que dans une population de femmes enceintes (Santana et al., 2015).

La protéine OWP8 a également été proposée, mais les faiblesses dans la définition de la cohorte et l'absence de cas contrôles pour lesquelles l'infection par oocyste serait avérée ou probable, ne permet pas d'affirmer l'immunogénicité sélective de cette protéine (X.-Y. Liu et al., 2019).

Si les sérologies spécifiques des stades tachyzoïte et oocyste ont été explorées, seul BCLA a pour l'heure été identifiée comme marqueur sérologique du bradyzoïte (Dard et al., 2021). L'intérêt d'une sérologie spécifique de ce stade est pourtant multiple, puisque le kyste est impliqué dans la transmission et dans la chronicité de la maladie associée au risque de réactivation en cas d'immunodépression. D'autre part, la cinétique de la kystogénèse et la durée de la persistance sont mal connues chez l'humain. Une publication récente montre en effet que le dogme de la persistance de kyste à vie ne repose que sur de maigres arguments (Rougier et al., 2017). Puisque démontrer directement la présence des kystes chez l'humain s'avère difficile, les études s'appuient sur des techniques sérologiques utilisant préférentiellement des antigènes du stage tachyzoïte pour conclure à une toxoplasmose chronique (ou immunité ancienne) ce qui conduit à conclure également à la présence de kystes chez ces patients. Cependant, si la persistance à long terme d'une réponse sérologique est belle est bien démontrée, rien n'indique qu'elle subsiste toute la vie de l'ensemble des individus, ni qu'elle est due spécifiquement à la présence de kystes. Rien ne prouve non plus que l'infection induit systématiquement la formation de kystes chez

tout individu infecté, ni que toutes les souches ont le même potentiel de kystogénèse chez l'humain. Aussi, l'absence de marqueurs de portage de kystes affaiblit-elle les études qui prêtent des répercussions cliniques ou comportementales à l'infection chronique par *T. gondii*.

La positivité de la sérologie BCLA est associée au portage de kystes en modèle murin. Chez l'humain, si la positivité est plus fréquente chez les patients présentant une immunité ancienne, seuls 62% des patients de ce groupe sont séropositifs pour BCLA, et un certain nombre de patients séronégatifs présentent une sérologie positive également. En l'absence de certitude concernant le portage ou non de kystes par ces patients, il est difficile de statuer sur ce qui relève de l'imprécision de la méthode ou de ce que l'on ignore encore de la physiopathologie de la toxoplasmose chronique chez l'humain.

Tableau 4. Antigènes recombinants de *T. gondii* évalués comme marqueurs sérologiques dans la toxoplasmose.

TA : Toxoplasmose aiguë ; TC : Infection chronique par *T. gondii* ; NI : sujet séronégatif selon les méthodes de référence ; DT : Dye test

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
SAG1 TGME49_233460 Tachyzoïte	(Aubert et al., 2000)	142 aigus	Globale : 74,1%		ELISA IgG	
	(Aubert et al., 2000)	105 chroniques 200 séronégatifs Abbott IMx Toxo IgM and IgG	TA : 73,2% TC : 75,2%			
			TA : 10,6%		ELISA IgM	
	(Chen et al., 2001)	124 sérums (non catégorisés en fonction de leurs résultats de routine mais en fonction des résultats de l'immunoblot rSAG1)	87.5% de concordance positive avec immunoblot rSAG1	100% concordance négative	ELISA	SAG1 tronquée + refolding
	(Nigro et al., 2003)	12 aigus 22 chroniques 25 séronégatifs DT, IgG et IgM-Indirect IF, complement fixation, IgM, IgA +/- IgE-ISAGA	TA : 8,3% TC : 13,6%	100%	ELISA IgG	Probable défaut de folding
	(Beghetto et al., 2003)	Aigus : 0 à 1 mois : 11; 1 à 2 mois : 9; 2 à 3 mois : 9; 3 à 4 mois : 9; 4 à 5 mois : 8 ; 5 à 6 mois : 8 ; 6 à 12 mois : 44 ; 12 à 24 mois : 23 ; 30 séronégatifs Technique de référence non précisée	92%	96,7%	ELISA IgG	
	(Chahed Bel-Ochi et al., 2013)	49 séronégatifs 42 séropositifs ELISA Platelia Toxo IgG kit +/- Toxo-Screen DA et Toxo-Spot IF	Sérum : 100% Salive : 69,4%		ELISA IgG	+ refolding

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
SAG1 TGME49_233460 Tachyzoïte	(Pietkiewicz et al., 2004)	72 aigus 82 chroniques IF indirect IgG maison, IgG ELISA (com-ELISA) (Organon-Teknika, Boxtel, TOXO-ISAGA PLUS IgA/IgM et VIDAS TOXO IgG AVIDITY	TA : 98,6% TC : 90,2%		ELISA IgG	
	(Buffolano et al., 2005)	101 sérums d'enfants dont la mère a présenté une séroconversion pendant la grossesse 32 toxoplasmoses congénitales 69 non infectés 30 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas et ISAGA-IgM (bioMérieux) et ELISA-IgA (Sanofi-Pasteur)	75%	33% de NI positifs 0 séronégatifs positifs	ELISA IgG	
			66%	4,3% de NI positifs	ELISA IgM	
	(Wu et al., 2009)	242 sérums humains	Concordance avec WB : 93,9%	ELISA	SAG1 tronquée	
	(Cóceres et al., 2010)	20 IgG+, IgM+ 24 IgG+, IgM- 26 séronégatifs IgG-Indirect IFA and inhouse test IgM-ISAGA	TA : 85% TC : 70.8%	/	ELISA IgG	
	(Jalallou et al., 2010)	153 séropositifs 20 séronégatifs ELISA Euroimmun	88,4%	84%	ELISA IgG	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
SAG1 TGME49_233460 Tachyzoïte	(M. (Mina) Selseleh et al., 2012)	74 IgG + 70 IgM + 60 séronégatifs	93%	95%	ELISA IgG	
	(M. (Mina) Selseleh et al., 2012)	IgG et IgM ELISA Trinity Biotech	87%	95%	ELISA IgM	
	(Kotresha et al., 2012)	20 aigus 20 chroniques 20 séronégatifs ELISA IgG et IgM Platelia (BioRad)	TA : 100% TC : 80%	80%	Western blot	
	(Allahyari et al., 2015)	15 aigus 51 chroniques 25 séronégatifs ELISA IgG, IgM et avidité IgG (Euroimmun)	96.1%	100%	ELISA IgG	
SRS3 TGME49_308840 Tachyzoïte	(Mirzadeh et al., 2017)	90 aigus et chroniques 81 séronégatifs ELISA IgG, IgM et avidité IgG (Euroimmun)	TA : 83% TC : 100%	91%	ELISA IgG	SRS3 tronquée / contrôle de la conformation
SAG2A / SAG2 / p22 TGME49_271050 Tachyzoïte	(Béla et al., 2008)	30 aigus 30 chroniques 23 séronégatifs ELISA-IgG, ISAGA IgM et IgA	TA : 93.3% TC : 96.7	100%	ELISA IgG	
	(Parmley et al., 1992)	31 aigus	TA : 100%			

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
SAG2A / SAG2 / p22 TGME49_271050 Tachyzoïte		31 chroniques 26 séronégatifs DT, IgM ELISA, IgA ELISA et agglutination différentielle	TC : 74,2%			
	(Hiszczyńska-Sawicka et al., 2005)	33 aigus 57 chroniques 9 négatifs	95.6% (TA : 93.9% TC: 96.5%)	100%	ELISA IgG	SAG2 tronqué
	(Ling Lau & Yik Fong, 2008)	40 aigus 20 chroniques 20 séronégatifs	TA : 87,5% TC : 100%	100%	ELISA IgG-IgM	Hyperglycosylée (Production en <i>Pichia pastoris</i>)
GRA1 TGME49_270250 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Pietkiewicz et al., 2004)	72 aigus 82 chroniques IF indirect IgG maison, IgG ELISA (com-ELISA) (Organon-Teknika, Boxtel, TOXO-ISAGA PLUS IgA/IgM et VIDAS TOXO IgG AVIDITY	TA : 83,3% TC : 80,5%		ELISA IgG	
GRA2 TGME49_227620 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Golkar et al., 2007)	24 aigus (France) 35 chroniques (France) 18 aigus (Iran) 28 chroniques (Iran) 28 séronégatifs France : Vidas Toxo IgG et IgM, IFI IgG et IgM IgM ISAGA ; 2 sérums consécutifs Iran : IgG et IgM-ELISA Euroimmun	TA : 95,8% (France) : 100% (Iran) TC : 65,7% (France) 71,4% (Iran)	96,4%	ELISA IgG	TRX-(Hisx6)-GRA2

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
	(Holec-Gąsior et al., 2009, p. 2)	37 aigus 90 chroniques 40 séronégatifs IgM-ELISA Vidas, IgG-ELISA Vidas, ISAGA M/A, Avidité IgG Vidas	TA : 100% TC : 22,5%	100%	ELISA IgG	
GRA3 TGME49_227280 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Beghetto et al., 2003)	Aigus : 0 à 1 mois : 11 ; 1 à 2 mois : 9 ; 2 à 3 mois : 9 ; 3 à 4 mois : 9 ; 4 à 5 mois : 8 ; 5 à 6 mois : 8 ; 6 à 12 mois : 44 ; 12 à 24 mois : 23 ; 30 séronégatifs Technique de référence non précisée	85%	100%	ELISA IgG	
GRA4 TGME49_310780 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Nigro et al., 2003)	12 aigus 22 chroniques 25 séronégatifs DT, IgG et IgM-Indirect IF, complement fixation, IgM, IgA +/- IgE-ISAGA	TA : 58,4% TC : 18,2%	100%	ELISA IgG	
GRA5 TGME49_286450 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Holec-Gąsior & Kur, 2010)	27 aigus 18 subaigus (avidité faible ou intermédiaire, absence d'IgM) 144 chroniques 31 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas, ISAGA M/A, Avidité IgG Vidas	TA : 63% Subaigus : 50% TC : 75%		ELISA IgG	
GRA6 TGME49_275440 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Redlich & Müller, 1998)	61 aigus 132 chroniques 100 négatifs 5 IgM persistantes	TA : 89%	TA : 99.6%	ELISA IgG	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
GRA6 TGME49_275440 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Hiszczyńska-Sawicka et al., 2005)	33 aigus 57 chroniques 9 négatifs	70.6 (TA : 93.9% ; TC : 63.1%)	100%	ELISA IgG	
	(Golkar et al., 2008)	24 aigus (séroconversion < 4 mois) 34 chroniques 30 séronégatifs	Cutoff 1: TA : 95.8% TC : 44.1% Cutoff 2 : TA : 87,5 TC : 5,9	90%	ELISA IgG	Négatif en phase chronique
	(Elyasi et al., 2010)	138 sérums 23 + 35 aigus 22 + 40 chroniques 18 seronegatifs	Cohorte française : TA : 87% TC : 72.3%	100%	ELISA IgG	
			100% des TC au-dessus du seuil, 95% des TA en dessous	Avidité		
	(R. H. Ybañez & Nishikawa, 2022)	88 sérums 27 IgG positifs 61 IgG négatifs Platelia IgG	92,6%	100%	ELISA IgG	
GRA7 TGME49_203310 Tachyzoïte et bradyzoïte	(D. Jacobs et al., 1999)	67 aigus 85 chroniques 48 séronégatifs	TA :94% TC : 79%	98%	ELISA IgG	
	(Aubert et al., 2000)	165 aigus 105 chroniques 200 séronégatifs Abbott IMx Toxo IgM and IgG	Globale : 83,4% TA: 95,1% TC: 67,6%		ELISA IgG	
			TA: 50,7%		ELISA IgM	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
GRA7 TGME49_203310 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Nigro et al., 2003)	12 aigus 22 chroniques 25 séronégatifs DT, IgG et IgM-Indirect IF, complement fixation, IgM, IgA +/- IgE-ISAGA	TA : 75% TC : 36,3%	100%	ELISA IgG	
	(Beghetto et al., 2003)	Aigus : 0 à 1 mois : 11; 1 à 2 mois : 9; 2 à 3 mois : 9; 3 à 4 mois : 9; 4 à 5 mois : 8 ; 5 à 6 mois : 8 ; 6 à 12 mois : 44 ; 12 à 24 mois : 23 ; 30 séronégatifs Technique de référence non précisée	85%	100%	ELISA IgG	
	(Pietkiewicz et al., 2004)	72 aigus 82 chroniques IF indirect IgG maison, IgG ELISA (com-ELISA) (Organon-Teknika, Boxtel, TOXO-ISAGA PLUS IgA/IgM et VIDAS TOXO IgG AVIDITY	TA : 95,7% TC : 78%		ELISA IgG	
	(Cóceres et al., 2010)	20 IgG+, IgM+ 24 IgG+, IgM- 26 séronégatifs IgG-Indirect IFA et inhouse IgM-ISAGA	TA : 85% TC : 66.6%		ELISA IgG	
	(M. Selseleh et al., 2012)	74 IgG + 70 IgM + 60 séronégatifs IgG et IgM ELISA Trinity Biotech	89%	90%	ELISA IgG	
			96%	90%	ELISA IgM	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
GRA7 TGME49_203310 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Kotresha et al., 2012)	20 aigus 20 chroniques 20 séronégatifs ELISA IgG et IgM Platelia (BioRad)	TA : 100% TC : 40%	100%	Western blot	
	(R. H. D. Ybañez & Nishikawa, 2020)	88 sérums 27 IgG positifs 61 IgG négatifs Platelia Toxo IgG et IgM / Toxocheck-MT	93,1%	100%	ICT	
	(R. H. Ybañez & Nishikawa, 2022)	88 sérums 27 IgG positifs 61 IgG négatifs Platelia IgG	100%	100%	ELISA IgG	
GRA8 (p35) TGME49_254720 Tachyzoïte	(Aubert et al., 2000)	165 aigus 105 chroniques 200 séronégatifs Abbott IMx Toxo IgM and IgG	Globale :70% TA:94,4% TC:37,1%		ELISA IgG	
	(Aubert et al., 2000)	165 aigus 105 chroniques 200 séronégatifs Abbott IMx Toxo IgM and IgG	TA: 54,9%		ELISA IgM	
	(Suzuki et al., 2000)	20 aigus 33 chroniques 16 IgM persistantes DT, IgM ELISA, IgA ELISA, agglutination différentielle	TA : 90%	25% de positifs dans le groupe IgM persistants ; Aucun TC détecté	ELISA IgM	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
GRA8 (p35) TGME49_254720 Tachyzoïte	(Li et al., 2000)	41 aigus 50 chroniques 50 séronégatifs DT, IgM ELISA, IgA ELISA, agglutination différentielle	TA : 85,3% TC : 8%	Seuls 8% de TC sont détectés	ELISA IgG	
	(Hiszczyńska-Sawicka et al., 2005)	33 aigus 57 chroniques 9 négatifs	65.2% (TA : 86.7% ; TC : 54.5%)	100%	ELISA IgG	
	(Lu et al., 2006)	50 aigus 50 chroniques 25 séronégatifs IgM-ELISA, IgG ELISA, IHAT maison ?	TA : 100% SC récente : 88% TC IgM persistant : 16% TC : 4%	96%	ELISA IgM	
GRA14 TGME49_239740 Tachyzoïte et bradyzoïte	(R. H. Ybañez & Nishikawa, 2022)	88 sérums 27 IgG positifs 61 IgG négatifs Platelia IgG	40,7%	100%	ELISA IgG	
AMA1 TGME49_255260 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Buffolano et al., 2005)	104 sérums d'enfants dont la mère a présenté une séroconversion pendant la grossesse 35 toxoplasmoses congénitales 69 non infectés 30 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas et ISAGA-IgM (bioMérieux) et ELISA-IgA (Sanofi- Pasteur)	57%	15% de NI positifs 1 séronégatifs positifs	ELISA IgG	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
ROP1 TGME49_309590 Tachyzoïte++ et bradyzoïte	(Aubert et al., 2000)	165 aigus 105 chroniques 200 séronégatifs Abbott IMx Toxo IgM and IgG	Globale: 59% TA:86,6% TC:21,9%		ELISA IgG	
	(Aubert et al., 2000)	165 aigus 105 chroniques 200 séronégatifs Abbott IMx Toxo IgM and IgG	TA: 58,5%		ELISA IgM	
	(Holec-Gąsior et al., 2009)	37 aigus 90 chroniques 40 séronégatifs IgM-ELISA Vidas, IgG-ELISA Vidas, ISAGA M/A, Avidité IgG Vidas	TA : 94,6% TC : 15,5%	100%	IgG ELISA	
ROP2	(Aubert et al., 2000)	165 aigus 105 chroniques 200 séronégatifs Abbott IMx Toxo IgM and IgG	Globale: 58,3% TA:65,5% TC:48,8%		ELISA IgG	
			TA : 12,7%		ELISA IgM	
	(Nigro et al., 2003)	12 aigus 22 chroniques 25 séronégatifs DT, IgG et IgM-Indirect IF, complement fixation, IgM, IgA +/- IgE-ISAGA	TA : 83,3% TC : 54,5%	100%	ELISA IgG	
ROP5 TGME49_308090	(Grzybowski et al., 2015)	34 aigus 40 chroniques IgM+ 46 chroniques IgM-	26%	91%	ELISA IgG	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
Tachyzoïte et bradyzoïte		26 séronégatifs NovaLisa <i>Toxoplasma gondii</i> IgG Avidité – autres tests de référence non précisés				
	(Grzybowski et al., 2015)	34 aigus 40 chroniques IgM+ 46 chroniques IgM- 26 séronégatifs NovaLisa <i>Toxoplasma gondii</i> IgG Avidité – autres tests de référence non précisés	23%	100%	ELISA IgM	
ROP8 TGME49_215775 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Sonaimuthu et al., 2014)	55 aigus 50 chroniques 100 séronégatifs Captia™ <i>Toxoplasma gondii</i> IgG et IgM	TA : 83,6% TC : 82%	94%	Western blot	
ROP18 TGME49_205250 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Grzybowski et al., 2015)	34 aigus 40 chroniques IgM+ 46 chroniques IgM- 26 séronégatifs NovaLisa <i>Toxoplasma gondii</i> IgG Avidité – autres tests de référence non précisés	38%	93%	ELISA IgG	
			68%	76%	ELISA IgM	
MIC2 TGME49_201780	(Buffolano et al., 2005)	104 sérums d'enfants dont la mère a présenté une séroconversion pendant la grossesse	MIC2a : 97% MIC2b : 83%	MIC2a 49% de NI positifs	ELISA IgG	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
Tachyzoïte et bradyzoïte		35 toxoplasmoses congénitales 69 non infectés 30 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas et ISAGA-IgM (bioMérieux) et ELISA-IgA (Sanofi-Pasteur)		0 séronégatifs positifs MIC2b 32% de NI positifs 0 séronégatifs positifs		
			MIC2a : 60% MIC2b : 51%	MIC2a : 0 NI positif MIC2b : 1 NI positif	ELISA IgM	
M2AP (MIC2 associated protein) TGME49_214940 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Buffolano et al., 2005) et (Beghetto et al., 2003)	104 sérums d'enfants dont la mère a présenté une séroconversion pendant la grossesse 35 toxoplasmoses congénitales 69 non infectés 30 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas et ISAGA-IgM (bioMérieux) et ELISA-IgA (Sanofi-Pasteur)	89%	43% de NI positifs 0 séronégatifs positifs	ELISA IgG	
			49%	1,4% de NI positifs	ELISA IgM	
MIC3 TGME49_319560 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Beghetto et al., 2003)	Aigus : 0 à 1 mois : 11; 1 à 2 mois : 9; 2 à 3 mois : 9; 3 à 4 mois : 9; 4 à 5 mois : 8 ; 5 à 6 mois : 8 ; 6 à 12 mois : 44 ; 12 à 24 mois : 23 ; 30 séronégatifs	95%	100%	ELISA IgG	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
		Technique de référence non précisée				
	(Beghetto et al., 2003) (Beghetto et al., 2003)	121 sérums (20 ≤ 2 mois ; 101 > 2 mois)	100% des T>2 mois au-dessus du seuil, 100% des T≤2 mois en dessous		Avidité	
	(Buffolano et al., 2005)	104 sérums d'enfants dont la mère a présenté une séroconversion pendant la grossesse 35 toxoplasmoses congénitales 69 non infectés (NI) 30 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas et ISAGA-IgM (bioMérieux) et ELISA-IgA (Sanofi-Pasteur)	94%	29% de NI positifs 0 séronégatifs positifs	ELISA IgG	
	(Buffolano et al., 2005)	104 sérums d'enfants dont la mère a présenté une séroconversion pendant la grossesse	31%	0 NI positifs	ELISA IgM	
MIC4 TGME49_208030 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Buffolano et al., 2005)	35 toxoplasmoses congénitales 69 non infectés (NI) 30 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas et ISAGA-IgM (bioMérieux) et ELISA-IgA (Sanofi-Pasteur)	49%	3% de NI positifs 0 séronégatifs positifs	ELISA IgG	
HSP20 TGME49_232940 Tachyzoïte et bradyzoïte	(Cócères et al., 2010)	20 IgG+, IgM+ 24 IgG+, IgM- 26 séronégatifs	TA : 80% TC : 62,5%	100%	ELISA IgG	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
		IgG-Indirect IFA et in house test IgM-ISAGA				
MAG1 TGME49_270240 Bradyzoïte ++ mais également tachyzoïte	(Holec et al., 2007)	37 aigus 80 chroniques 10 séronégatifs IgG et IgM-ELISA Vidas, Toxo-ISAGA plus IgM/IgA, IgG avidité Vidas	TA : 97,3% TC : 7,5%	100%	ELISA IgG	
Sporo-SAG TGME49_258550 Stades sexués, tachyzoïte et bradyzoïte	(Crawford et al., 2010)	13 sérums d'une épidémie (oocystes)	0 positif			Expression en baculovirus sur cellules d'insectes
ERP TGME49_276850 Sporozoïte bradyzoïte	(Hill et al., 2011)	G1: 6 infections par oocystes (certain) G2 : 11 sérums de l'épidémie d'Atlanta 1977 (oocystes) G3 : 182 séropositifs (étiologie inconnue) G4 : Sérums infection par oocystes probable (viande bien cuite/présence de chats) G5 : 76 séroconversions pendant la grossesse (dont 3 pendant épidémies liées à oocystes) G6 : 55 séronégatifs DT, Biomerieux direct agglutination assay, IgM et IgA ELISA, IgM ISAGA	G1 : Apparition IgG et IgM dans le mois suivant l'infection – persistance 5 à 8 mois G2 : 9 positifs (1 négatif prélevé 5 mois après l'exposition) G3 : 24% de positifs (dont la moitié infection aigue) G4 : 6 positifs (1 infection congénitale)		Western blot +/- ELISA	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
ERP TGME49_276850 Sporozoïte bradyzoïte			et un non-infecté négatif) G5 : 78% positifs (dont les. 3 en lien avec l'épidémie) G6 : 0 positif			
CCp5A Oocyste	(Santana et al., 2015)	78 sérums – épidémie (oocystes) 78 IgG+/IgM+ (Brésil)	Épidémie : 92% positifs Séropositifs : 76% positifs		IgM ELISA	
			Épidémie : 82% positifs Séropositifs : 52% positifs		IgG ELISA	
OWP8 TGVEG_271580 Oocyste	(X.-Y. Liu et al., 2019)	145 séronégatifs 24 séropositifs. GRA7 IgG-ELISA GRA7 et CCp5A	3,6% positifs OWP8 3% positifs CCP5A (Concordance entre les 2 marqueurs non indiquée)		IgG ELISA	- Pas de temporalité - Pas de population contrôlée infectée par oocystes
BCLA TGME49_209755 Bradyzoïte	(Dard et al., 2021)	43 séronégatifs 79 immunités anciennes 18 toxoplasmoses oculaires	Séronégatifs : 11,6% de séropositifs BCLA		IgG ELISA	

Antigène	Référence	Essais chez l'humain			Méthode	Commentaires
Gène Stade d'expression		Cohorte	Sensibilité	Spécificité		
		5 réactivations asymptomatiques chez l'immunodéprimé 7 toxoplasmoses disséminées IgG et IgM-ELISA Vidas et Architect	Immunités anciennes : 61,9% de séropositifs BCLA Toxoplasmoses disséminées : 55,6% Réactivations asymptomatiques : 100% Toxoplasmose oculaire : 61,1%			

CHAPITRE II : DETECTION SEROLOGIQUE D'ANTIGENES DU STADE CHRONIQUE DE *TOXOPLASMA GONDII* : IDENTIFICATION D'UN MARQUEUR SEROLOGIQUE DU BRADYZOÏTE

1. INTRODUCTION

Les chapitres précédents mettent en évidence l'ampleur de la toxoplasmose comme infection opportuniste ou congénitale chez l'humain, mais également comme infection zoonotique extrêmement répandue et associée à un risque alimentaire conséquent. Est souligné également le rôle crucial des bradyzoïtes et des kystes dans la physiopathologie de la toxoplasmose. D'abord parce qu'ils sont au cœur de la transmission entre hôtes intermédiaires par carnivorisme. Ensuite, parce qu'ils sont liés à la persistance à long terme du parasite chez ses hôtes. Enfin, parce qu'ils constituent le point de départ de la réactivation en cas d'immunodépression.

Pourtant, les difficultés inhérentes à l'étude de la chronicité en modèle animal et d'autant plus chez l'humain sont nombreuses (variabilité inter-espèce du phénomène, durée des expérimentations pour couvrir l'évolution, inaccessibilité des kystes, absence de technique non invasive de détection) et contraignent les recherches sur ce stade de l'infection. Alors même que des conséquences sur la santé mentale voire un risque oncologique sont suspectés être en lien avec l'infection chronique par *T. gondii* chez l'humain, l'étude de ces hypothèses se limite à l'observation de relations indirectes, faute de méthode non invasive de détection des kystes.

L'identification par notre équipe de BCLA comme marqueur sérologique du portage de kystes a ouvert la voie à la recherche de méthodes non invasives d'étude de la chronicité *in vivo* (Dard et al., 2021). Si la sérologie BCLA est en quasi-parfaite adéquation avec la charge parasitaire cérébrale chez la souris, il est plus difficile d'évaluer ce marqueur chez l'humain. L'interprétation des résultats est délicate notamment parce qu'en l'absence d'autre méthode ciblant spécifiquement le kyste, ils sont comparés aux données de sérologies classiques axées sur le tachyzoïte.

Mon travail de thèse s'inscrit donc dans la suite de cette première étude, et a consisté d'une part à rechercher d'autres marqueurs sérologiques du stade kystique de *T. gondii*, et d'autre part à évaluer l'intérêt de la sérologie bradyzoïte pour détecter la présence de kystes et son apport potentiel au diagnostic de la toxoplasmose chez l'humain.

Pour ce faire, j'ai pu m'appuyer sur les récents travaux d'épigénétique de notre équipe et sur le développement de l'outil MORC-mAID qui permet via la déplétion inductible de ce régulateur de la bascule transcriptionnelle chez *T. gondii*, l'expression en culture *in vitro* et en grande quantité, de protéines spécifiques du bradyzoïte (Farhat et al., 2020).

Les travaux ainsi menés sont présentés dans l'article qui suit. Ils sont suivis d'une discussion générale et des perspectives envisagées suite à ce travail.

2. ARTICLE 2

SEROLOGICAL DETECTION OF TOXOPLASMOSIS DORMANCY BY CYST- AND BRADYZOITE-SPECIFIC BIOMARKERS

Auteurs : Marie G. Robert^{1,2, #}, Christopher Swale^{1, #}, Valeria Bellini¹, Dominique Cannella¹, Laurence Braun¹, Alexandre Bougdour¹, Charlotte Corrao¹, Lucid Belmudes³, Yohann Couté³, Hervé Pelloux^{1,2}, Marie-Pierre Brenier-Pinchart^{1,2,† *} and Mohamed-Ali Hakimi^{1,†,*}

Ces auteurs ont contribué à parts égales à ce travail.

† Ces auteurs ont contribué à parts égales à ce travail.

Résumé en français

Le protozoaire *Toxoplasma gondii* est l'agent étiologique de la toxoplasmose, une maladie zoonotique et alimentaire très répandue, pouvant être particulièrement sévère lorsqu'elle est opportuniste ou congénitale. Ce parasite intracellulaire obligatoire doit sa forte prévalence dans le monde entier à son cycle de vie hétéroxène, ainsi qu'à sa capacité à utiliser de multiples voies de transmission et à maintenir une infection chronique de l'hôte sur de longues périodes. Cette persistance est un facteur important dans la transmission de l'infection par carnivorisme, c'est également l'origine de réactivation en cas d'immunosuppression. Cependant, le stade bradyzoïte dormant, qui est enfermé dans un kyste et reste latent chez l'hôte, reste relativement peu étudié, principalement parce qu'il n'existe pas de méthode non invasive pour évaluer son devenir dans les tissus profonds tels que le cerveau. Bien que la sérologie soit un élément clé des études épidémiologiques et du diagnostic de cette maladie parasitaire, et que la contribution des bradyzoïtes à la physiopathologie de l'infection soit sans équivoque, aucun des tests sérologiques actuellement utilisés n'est basé sur des antigènes spécifiques des bradyzoïtes et/ou des kystes. La découverte récente de l'antigène BCLA associé à la charge kystique cérébrale a démontré que les antigènes de stade chronique présentent une certaine immunogénicité. Dans cette étude, nous avons passé au crible le protéome du bradyzoïte à la recherche de protéines immunogènes candidates de manière impartiale et nous avons identifié BSM (*Bradyzoite Serological Marker*), un second biomarqueur sérologique de la chronicité de *Toxoplasma* chez la souris. La sérologie BSM distingue correctement les souris porteuses de kystes avec une sensibilité et une spécificité de 97,96% (IC95 : 89,31 - 99,90) et 100,0% (IC95 : 86,20 - 100,0) respectivement. Chez l'humain, les deux marqueurs de bradyzoïte BCLA et BSM sont en assez bon accord ($\kappa=0,390$) et, de manière inattendue, positifs chez

seulement 27,59% des patients ayant une immunité ancienne, ce qui soulève de nombreuses questions. Néanmoins, ces marqueurs pourraient fournir de nouveaux standards de référence pour étudier la physiopathologie de la toxoplasmose chronique chez l'humain, en particulier le portage de kystes, qui a été peu décrit.

Serological Detection of Toxoplasmosis Dormancy by Cyst- and Bradyzoite-specific Biomarkers

Marie G. Robert^{1,2, #}, Christopher Swale^{1, #}, Valeria Bellini¹, Dominique Cannella¹,
Laurence Braun¹, Alexandre Bougdour¹, Charlotte Corrao¹, Lucid Belmudes³,
Yohann Couté³, Hervé Pelloux^{1,2}, Marie-Pierre Brenier-Pinchart^{1,2,† *} and Mohamed-
Ali Hakimi^{1,†,*}

¹ Team Host-Pathogen Interactions and Immunity to Infection, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Grenoble Alpes University, Grenoble, France.

² Laboratory of Parasitology and Mycology, Grenoble Alpes University Hospital, CS10217, 38043 Grenoble, France.

³ Grenoble Alpes University, INSERM, CEA, UMR BioSante U1292, CNRS, CEA, FR2048 38000, Grenoble, France.

* Correspondence to:

Mohamed-Ali Hakimi (ORCID: [0000-0002-2547-8233](https://orcid.org/0000-0002-2547-8233))

E-mail : mohamed-ali.hakimi@inserm.fr

Marie-Pierre Brenier-Pinchart (ORCID: [0000-0003-1366-5856](https://orcid.org/0000-0003-1366-5856))

E-mail : MPPinchart@chu-grenoble.fr

These authors contributed equally to this work.

† These authors contributed equally to this work.

Key words: *Toxoplasma gondii*, serological marker, recombinant antigen, toxoplasmosis, chronic infection

ABSTRACT

The protozoan *Toxoplasma gondii* is the etiological agent of toxoplasmosis, a widespread zoonotic and foodborne disease potentially particularly severe when opportunistic or congenital. This obligate intracellular parasite owes its high prevalence worldwide to its ability to have a life cycle with multiple hosts, to use multiple routes of transmission, and to maintain chronic infection of the host over long periods of time. This persistence is an important factor in the transmission of infection by carnivorousism and the source of reactivation in the case of immunosuppression. However, the dormant bradyzoite stage, which is enclosed in a cyst and remains latent in the host, remains relatively understudied, mainly because there are no noninvasive methods to assess its fate in deep tissues such as the brain. Although serology is a key element for epidemiological studies and diagnosis of this parasitic disease, and although the contribution of bradyzoites to the pathophysiology of infection is unequivocal, none of the currently used serologic tests are based on bradyzoite and/or cyst-specific antigens. The recent discovery of the Brain Cyst Load-associated Antigen (BCLA) has demonstrated that chronic stage antigens exhibit some immunogenicity. In this study, we screened the bradyzoite proteome for immunogenic protein candidates in an unbiased manner and identified the Bradyzoite Serological Marker (BSM) as a second serological biomarker for *Toxoplasma* chronicity in mice. BSM serology correctly distinguishes cyst-bearing mice with a sensitivity and specificity of 97.96% (IC95: 89.31 - 99.90) and 100.0% (IC95: 86.20 - 100.0) respectively. In humans, both bradyzoite markers BCLA and BSM are in fair agreement ($\kappa=0.390$) and unexpectedly positive in only 27.59% of patients with past immunity, raising many questions. Nevertheless, they could provide new reference standards for studying the

pathophysiology of chronic toxoplasmosis in humans, especially cyst carriage, which has been poorly described.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is considered one of the most successful parasitic pathogens in the world and owes this success to the flexibility of its multi-host life cycle that relies on a final host (Felidae) for sexual transmission, while asexual transmission occurs in its intermediate hosts, i.e., any warm-blooded animals, including rodents and humans. Host infection occurs mostly through the fecal-oral and the carnivorous routes. Once inside a feline enterocyte, the bradyzoite transforms into a merozoite, clearly initiating the onset of the *in vivo* sexual cycle. After several rounds of asexual replication, merozoites initiate the formation of gametes, which in turn give rise to postfertilization transmissible oocysts that sporulate when exposed to atmospheric oxygen. After ingestion, the sporozoites are released from the oocysts and differentiate into tachyzoites, which cause acute infection by multiplying intensively and spreading to complex organs such as the brain. Subsequently, partly under the influence of a strong immune response, tachyzoites transform into bradyzoites, a zoite that expresses its own repertoire of genes to promote slower metabolism and adaptation to prolonged latency in cystic structures found in long-lived cells, preferably in skeletal muscle, myocardium, brain, and eyes (Dubey et al., 1998). When a cat preys on a cyst-bearing animal, the parasite's life cycle closes.

The infection, which is widespread in livestock, can be particularly damaging, and in small ruminants for example (Stelzer et al., 2019), causes substantial economic losses, and provide a reservoir for transmission to humans (Kijlstra & Jongert, 2009). Among the latter, seroprevalence is estimated to exceed 30% worldwide, with considerable geographic variation depending on dietary habits, hygiene practices, and

76 environmental conditions (Bigna et al., 2020; Pappas et al., 2009). Although
77 toxoplasmosis is usually benign or even asymptomatic in immunocompetent
78 individuals, primary maternal infection during pregnancy is a significant cause of
79 congenital infection, leading to potentially fatal fetal harm. In addition, toxoplasmosis
80 can be particularly severe and life-threatening in immunocompromised individuals, in
81 most cases due to reactivation from cysts and differentiation of bradyzoites into
82 tachyzoites. However, the risk of reactivation from cysts is not limited to
83 immunocompromised individuals, and both congenital and acquired toxoplasmosis can
84 result in ocular toxoplasmosis remote from acute infection (Delair et al., 2008). Thus,
85 toxoplasmosis is one of the main cause of posterior uveitis worldwide (Furtado et al.,
86 2013).

87 The diagnosis of toxoplasmosis is primarily based on direct methods, mainly the
88 detection of parasite DNA in biological samples, and indirect methods, which include
89 searching for antibodies directed against *T. gondii* that are produced after exposure to
90 the parasite (Dard et al., 2016; Robert et al., 2021). Serology relies on the kinetics of
91 different antibody isotypes, mainly IgG and IgM, to determine among others, infection
92 status and assess the risk of congenital toxoplasmosis or donor-to-recipient
93 transmission after transplantation, and its outcome determines the implementation of
94 the appropriate preventive measures. However, the exact dating of the infection, which
95 may be crucial in certain situations, often remains difficult to determine (Dard et al.,
96 2016). Much of the existing serologic testing relies on native tachyzoite antigens.
97 However, in an effort to improve the performance and accuracy of serologic diagnosis
98 and to optimize the standardization of antigen preparations, different recombinant
99 antigens have also been studied alone or in combinations (Ybañez et al., 2020).
100 Although bradyzoites and cysts are responsible for host-to-host transmission,

chronicity of infection and its reactivation, bradyzoite-specific antigen is not commonly used in serology. Since there is no simple and noninvasive method to confirm carriage of the chronic form, one usually relies mainly on the presence of IgG directed against tachyzoite stage, paradoxically involved in the acute infection. However, the kinetics of cystogenesis and the duration of persistence remain poorly understood, and the prevailing dogma that any infection leads to the formation of cysts that persist in human for life tends to be challenged (Rougier et al., 2017). Although the cyst has long been considered a homogeneous and quiescent entity, a recent study shows that it is actually a dynamic entity, that harbors sporadic and sometimes synchronous replication of bradyzoites (Watts et al., 2015). Some studies also suggest an association between behavioral changes or mental disorders and chronic *T. gondii* infection (reviewed by Johnson & Koshy, 2020). However, in the absence of a specific method to evaluate the presence of cysts indicative of chronic infection, it is not only difficult to study the pathophysiology but also the impact of the latter.

Although a previous study suggests that anti-*Toxoplasma* antibodies are mainly directed against the tachyzoite and only to a minor extent against cysts (Zhang et al., 1995), we have recently demonstrated the immunogenicity of the bradyzoite-specific protein BCLA, which is localized to the membrane of the parasitophorous vacuole (Dard et al., 2021). The importance of BCLA as a reliable serological biomarker for cyst carriage has been established in an animal model with perfectly controlled infection and kinetics. In human sera, BCLA ELISA rates were significantly higher in individuals with past immunity identified by conventional techniques, with particularly high rates in subgroups of patients with clinical forms associated with the presence of cysts, i. e., ocular toxoplasmosis or asymptomatic reactivation (Dard et al., 2021). However, the wide dispersion of titers, the lack of reactivity of some sera from seropositive patients,

and the positivity of some sera from seronegative patients remain difficult to interpret because in humans, unlike in mouse models, the only possible comparison is with tachyzoite markers.

In an attempt to improve and complement bradyzoite antigen-based serology, we examined additional serological markers for the bradyzoite stage by using genetically modified parasites that can be induced to express bradyzoite-specific proteins *in vitro* and compared reactivity patterns (Farhat et al., 2020). This strategy allowed us to identify the protein BSM (Bradyzoite Serological Marker). We then evaluated the diagnostic performance of BCLA and BSM serological markers in humans compared with conventional serological methods.

RESULTS

Identification of immunogenic cystic markers in MORC knockdown extracts enriched in bradyzoite proteins.

MORC acts in tachyzoites in cooperation with histone deacetylase HDAC3 to restrict chromatin accessibility to the transcriptional machinery at genes expressed exclusively during the sexual and chronic stages (Farhat et al., 2020). MORC-depleted cells underwent marked transcriptional changes leading to the expression of a large repertoire of bradyzoite-specific genes, i.e., up to 50% of the chronic sub-transcriptome. Inhibition of HDAC3 by the HDAC inhibitor FR235222 phenocopies the depletion of MORC by triggering a switch from tachyzoites to bradyzoites (Farhat et al., 2020). The discovery of new immunogenic bradyzoite proteins has been hampered by the difficulties in generating large numbers of these highly specialized zoites *in vitro*. The lack of starting materials can now be overcome by overexpression (e.g. BFD1;

(Waldman et al., 2020)) or silencing (e.g. MORC/HDAC3; (Farhat et al., 2020)) of genetic switches that control development into bradyzoites. Monitoring of proteomic changes after MORC knockdown revealed that robust mRNA expression of bradyzoite genes was also reflected in the abundance of the corresponding proteins (Farhat et al., 2020), including BAG1 and BCLA, a hallmark of bradyzoites and latent tissue cysts, respectively (Fig. 1a). We hypothesized that knocking-down MORC would provide a good basis for identifying uncharacterized immunogenic bradyzoite markers. We therefore tracked the overall immunoreactivity of sera from chronically infected mice positive for BCLA (Dard et al., 2021) in fractions from five conventional chromatographic steps used to separate and concentrate MORC-depleted protein extracts (Fig. 1b). Against a background of pronounced immunological reactivity, only depletion of MORC shows a discrete protein signal with an apparent mass of about 80 kDa, independent of the genetic background of the parasite, in the sera of mice that have undergone chronic infection (Fig. 1c). After precipitation with ammonium sulfate at 30 % w/v, the MORC-depleted protein extract was further fractionated by gel filtration chromatography and spin filtration using a Centricon column (cut-off 30 kDa) (Fig. 1b and 1d). Silver staining analysis of the last chromatographic step revealed a nearly homogeneously purified polypeptide(s) with a size of 80 kDa (Fig. 1e) that reacted strongly and exclusively with sera from chronically infected mice (Fig. 1f). Mass spectrometry (MS) based proteomic analysis identified TGME49_216140 and TGME49_202020 proteins with high confidence based on their abundance, predicted molecular weight of 62 and 83 kDa, respectively, and expression profile restricted to the bradyzoite stage (Fig. 1g). It is worth noting that both proteins have already been shown to be induced in MORC-depleted cells (Farhat et al., 2020).

TGME49_202020 is expressed in bradyzoites and encodes an immunogenic protein.

To better document the silencing of their expression in tachyzoites by MORC, we endogenously Flag-tagged TGME49_216140 and TGME49_202020 in the RH MORC-mAID- HA lineage. As expected, IAA treatment of these edited parasites resulted first in near elimination of MORC and second in concomitant accumulation of the FLAG-tagged version of the TGME49_216140 and TGME49_202020 chimeric proteins (Fig. 2a). Both proteins were then immunopurified by anti-Flag affinity chromatography from MORC-depleted extracts, SDS-PAGE resolved, and analysed by Western blot to monitor their specific humoral response to infected mouse sera. While TGME49_216140 is clearly nonimmunogenic (Fig. 2b), TGME49_202020 is specifically detected by sera from mice chronically infected with type II strains that carry brain cysts (ME49 and 76K), but not by sera from NMRI mice infected with CTG, a type III strain in which chronic infection is characterized by a low cyst load at the limit of detection (Fig. 2c) (Dard et al., 2021). Based on its expression restricted to bradyzoites (Fig. 1g) and its reactivity with sera from mice bearing cysts, we hereafter refer to TGME49_202020 to as the bradyzoite serological marker or BSM. This protein has been independently referred to as DnaK-TPR, with respect to its heat shock protein (DnaK) and tetratricopeptide repeat (TPR) domains (Ueno et al., 2011).

The structure of BSM predicted by AlphaFold2 (downloaded from the EBI/AlphaFold repository), displays the two beforementioned DnaK and TPR domains which intricately fold against each other (Fig. 2d and 2e), suggesting a potential allosteric regulation of client protein binding by the TPR domain. The closest experimentally determined structural homologue to the DnaK domain is a bacterial Hsp70 (from *E. coli* K12) as determined by the Foldseek structural search engine (Kempen et al., 2022)

with a Tm score of 0.71 (significant homology is above a Tm score of 0.5) although only sharing 10.5% sequence homology. On the other hand, the TPR domain shows a partial structural alignment with parts of the human FKBP38 (Tm of 0.55 and 7.3% sequence identity). In all, structural predictions confidently predict this DnaK-TPR protein as an ATP-dependent chaperone which may specifically participate in bradyzoite specific protein folding pathways.

BSM accumulates in the cytoplasm of *in vitro* induced and fully differentiated bradyzoites.

To further document its subcellular location, we developed polyclonal antibodies against BSM. Upon MORC-depletion or inhibition of HDAC3, BSM could be detected exclusively in the cytoplasm of the induced bradyzoites, as evidenced by co-staining with *Dolichos biflorus lectin* (DBA) and BAG1 (Fig. 3a). BSM was no longer detected in the cytoplasm of the 76K strain treated with FR235222, which was genetically engineered to lack BSM (Δ bsm), confirming the specificity of the in-house antibody (Fig. 3b). Conversely, the induction of BCLA by FR235222 in the vacuolar space and at the PV membrane (PVM) was not affected by the absence of BSM (Fig. 3b). Because it is known that mature bradyzoites and complete cyst biogenesis of *T. gondii* cannot be achieved *in vitro* (Milligan-Myhre et al., 2016), we next examined the localization of BSM in histological brain sections of mice chronically infected with a cystogenic strain and confirmed the localization of BSM in the cytoplasm of fully differentiated bradyzoites (Fig. 3c).

***bsm*-deficient parasites have no growth defect *in vitro* and retain the ability to develop chronic infection in mice.**

bsm-deficient tachyzoites were able to grow and form plaques *in vitro*, as was the parental strain (Fig. 3d) in agreement with its fitness score of -0.12 (source ToxoDB). The consequences of *BSM* genetic deletion were then examined *in vivo* after intraperitoneal inoculation of $5 \cdot 10^4$ tachyzoites of the 76K Δbsm line to 8 NMRI mice. In parallel, 8 NMRI mice were also infected with the 76K wild-type strain. In both WT and Δbsm -Inocula, mice showed similar clinical symptoms such as weight loss and ruffled fur, but eventually survived infection, indicating that there is no significant difference between strains in terms of virulence over 2 months (Mantel-Cox test and Gehan-Breslow-Wilcoxon test $p=0.3496$) (Fig. 3e). Accordingly, all mice but one, which was excluded from the study, subsequently showed a strong adaptive immune response as determined by IgGII Western blots (LDBIO Diagnostics, Lyon, France)). Cystogenesis is unaffected in mice challenged with *bsm*-deficient parasites, and cysts exhibit normal round morphology consistent with that of the parental strain (Fig. 3f). However, parasite load was significantly higher in the brains of mice infected with 76K Δbsm (Fig. 3g), a striking result confirmed by higher expression levels of miR-146a and miR-155 (Fig. 3h), two host microRNAs associated with *Toxoplasma* persistence in the mouse brain (Cannella et al., 2014). This phenotype was overlooked by (Yang et al., 2017) probably because the infected mice were killed too early, after 30 days instead of after 2 months under our conditions. Nevertheless, this suggests that BSM may act as a pro-host effector that limits cyst burden.

Bradyzoite serology specifically identify cyst-bearing mice

To confirm the selective immunogenicity of BSM, we produced the recombinant BSM protein tagged with a C-terminal histidine tag using the baculovirus expression system. In contrast to expression in prokaryotic cells, eukaryotic proteins of immunogenic interest are produced with surface post translational modifications which closer resemble that of the native protein (Chambers et al., 2018) and have the added advantage of copurifying less immunogenic contaminants which are found in *E. coli* based expression strategies. After affinity purification on Ni-NTA resin (Fig. 4a) and size exclusion chromatography, highly purified recombinant BSM protein was obtained in significant amounts (Fig. 4b), so that it could be used to determine the immunogenicity of this protein. In parallel, to improve our original ELISA assay against BCLA we also expressed a new internally truncated version of BCLA displaying all the immunogenic regions of the protein in insect cells. This new version of the recombinant protein is natively soluble, stable and easy to purify, contrary to the bacteria produced C-terminus which required partial denaturation to solubilize. It comprises both the N-terminal beginning, a minimized immunogenic repeat regions (2 full repeats) and the predicted structured C-terminus. In total the protein has a predicted molecular weight of 75.6 kDa. Since previous ELISAs were performed with a partial fragment of BCLA produced in bacteria in combination with synthetic peptides (Dard et al., 2021) this has further standardized the antigene production process and reduced non-specific contaminants. Subsequently, an ELISA assay was developed and used to determine anti-BSM and anti-BCLA antibody titers of sera from 83 NMRI, CD1 and Balb/c mice that were left uninfected or chronically infected with different parasite lines.

BSM serology specifically identified mice infected with cystogenic strains (76K and ME49) that had a positive cerebral parasite load, with the exception of mice infected

with the 76K Δbsm strain, confirming the specificity of the assay (Fig. 5a). Mice infected with strains considered to be low cystogenic (culture-attenuated Pru Δ Ku80 and CTG) and had a very low or negative cerebral parasite load showed low or no anti-BSM titers (Fig. 5b). In the same way, BCLA serology identified cyst-bearing mice, including those infected with the 76K Δbsm strain but not those infected with noncystogenic strains (Fig. 5c). However, the performance of BCLA antigen in discriminating cyst carriage was slightly reduced when compared to the BSM antigen (area under the ROC curves: 0.9256 (IC95: 0.8651 – 0.9861) and 0.9923 (IC95: 0.9765 – 1), respectively, $p=0.0365$) (Hanley & McNeil, 1983) (Fig. 5d). ELISA cutoff values, i.e., 15.85 and 3.286 UI/ml for BSM and BCLA respectively, were determined from the ROC curves of each assay to favor specificity. BSM ELISA sensitivity and specificity were 97.96% (IC95: 89.31 - 99.90) and 100.0% (IC95: 86.20 - 100.0), respectively. BCLA ELISA sensitivity and specificity were 76.47% (IC95: 63.24 - 86.00) and 100.0% (IC95: 79.61 - 100.0), respectively. Agreement between the two serological tests was quantified by a kappa coefficient of 0.736, corresponding to substantial agreement (Landis & Koch, 1977).

Bradyzoite-specific serology in human patients with various forms of toxoplasmosis.

Whether BSM can be validated as a serological biomarker for presence of cysts during chronic infection in humans was the next obvious challenge. Therefore, we performed side-by-side ELISA assays to compare the reactivity of BCLA and BSM with human sera from a French toxoplasmosis biobank. The first step in this evaluation was to compare bradyzoite serology results between a group of patients with negative conventional serology ($n = 55$) and a group of patients identified as previously immunized ($n = 87$). Although a decrease in antibody titers below the detection limit of

conventional serology has been observed over time in some subjects (Burrells et al., 2016; Rougier et al., 2017), without knowing whether this is related to the disappearance of cysts, and although it is not certain that positive tachyzoite serology systematically coincides with the presence of cysts, it is logical to hypothesize that the presence of *T. gondii* cysts is common in subjects with positive conventional serology, and absent or possible anecdotal in subjects with negative serology.

As expected, significantly higher titers of anti-BCLA and anti-BSM antibodies were observed in the “past immunity” group with medians, 25% et 75% percentiles of 10.43, 1.86 and 20.86 vs 29.03, 15.30 and 57.68 UI/mL in the “seronegative” and “past immunity” group respectively with BCLA ELISA and 0.95, 0.79 and 1.40 vs 1.52, 0.98 and 2.62 (index ratio) with BSM ELISA ($p < 0.0001$ for both ELISA tests). However, the results were widely scattered, especially in the “past immunity” group with several patients with low titers (Fig. 6a and 6b). Based on the serological results between these two groups, ROC curves were generated for each of the tests to select appropriate thresholds (Fig. 6c). The AUCs between the ROC curves for BCLA and BSM serology were not significantly different (0.7989 and 0.7183 respectively, $p=0.100$) (Hanley & McNeil, 1983). For BCLA and BSM serology, the cutoff value was set at 34.68 UI/mL and 1.617 (index ratio), respectively. These thresholds allowed identification of patients with a past immunity with a sensitivity and specificity of 43.68% (IC95: 33.74 – 54.15) and 98.18% (IC95: 90.39 – 99.91), respectively, for BCLA serology and 47.13% (IC95: 36.98 – 57.51) and 87.27% (IC95: 75.98 – 93.70) for BSM serology. Subsequently, among patients with past immunity, we isolated the clinical contexts mainly related to reactivation from cysts, namely ocular toxoplasmosis ($n=23$), cerebral toxoplasmosis ($n=5$), and asymptomatic reactivations detected during the serological screening of immunocompromised patients ($n=6$). Despite a limited number of patients in these

subcategories, the bradyzoite serological titers were significantly higher than in the seronegative group of patients (Fig. 6a and 6b).

Agreement between the two tests was measured by calculating the Cohen's kappa coefficient as 0.390, which can be interpreted as "fair agreement" (Landis & Koch, 1977). Whereas only 12.7% of patients in the seronegative group had at least one positive bradyzoite serological test, this proportion reached 63.2% in the "past immunity" group, suggesting a more pronounced immune response to one or the other marker depending on the individual rather than a systematic detection of both markers altogether. We therefore determined a combined score based on both markers and corresponding to the product of the two serological results divided by a factor of 10 to balance the influence of the two markers on the final score. This combined score tended to improve discrimination between the different groups (Fig. 6d). The ROC curve shown in Fig. 6c was used to select the threshold of 4.798 that achieved a sensitivity of 51.72% (IC95: 41.38 – 61.93) for a specificity of 94.55% (IC95: 85.15 – 98.51). Thirteen patients with clinical involvement generally related to reactivation from cysts were found to have a negative combined score (Table 1).

Evaluation of the value of cyst and bradyzoite serology to discriminate acute and past infection

One component of the prevention strategy for congenital toxoplasmosis is maternal serologic screening and, in some countries, regular serologic follow-up of seronegative expectant mothers (van der Giessen et al., 2021). When screening is based on a single sample, and sometimes even when consecutive samples are available, dating the infection to determine risk to the fetus can be complex because of the possible persistence of IgM and sometimes atypical serologic profiles (Fricker-Hidalgo et al.,

2013; Gras et al., 2004). Therefore, one of the challenges in improving serology is to optimize the determination of the date of infection by finding methods that allow discrimination between recent and previous infection. To this end, serology based on bradyzoite antigens could be an interesting complementary option, as these antigens are considered delayed compared to tachyzoite antigens. To investigate the value of bradyzoite serology in dating infection, we evaluated the titers of bradyzoite serologies in 87 iterative sera that allowed dating of infection in 25 pregnant women who seroconverted during pregnancy. Of these, 58 sera could be accurately dated within 3 months of infection and were included in the "acute infection" group. Anti-BSM antibody titers were not significantly different between the "past infection" and "acute infection" groups ($p=0.1277$). However, this was the case for BCLA serology ($p=0.0002$), and the significance was strengthened by the combined score ($p<0.0001$) (Fig. 7).

DISCUSSION

Toxoplasmosis affects one-third of humanity and is considered one of the leading causes of death attributable to foodborne illness in the United States. The CDC has recognized this disease as one of the neglected parasitic infections in the United States that requires increased awareness among physicians and the public but also improvement in diagnostic testing and treatment (Ben-Harari & Connolly, 2019; Cantey et al., 2021). The current standard treatment for toxoplasmosis is based on a pyrimethamine-sulfadiazine combination, but this is fraught with severe side effects, especially in immunocompromised individuals, and cannot eradicate the chronic infection in humans because the tissue cysts remain inaccessible to any therapy.

Regrettably, despite its pathophysiological importance, the chronic stage in humans is poorly understood, underscoring the urgent need for noninvasive methods to detect cysts in patients. In addition, cysts can persist in infected animals and are a common source of infection for humans. Although surveillance measures in slaughterhouses have curbed certain foodborne infections, few measures have been taken at this level regarding this parasitosis, even though toxoplasmosis is one of the most important foodborne diseases (Bouwknegt et al., 2018; Kijlstra & Jongert, 2009). One of the reasons for this is the lack of a validated serological test that correlates with the presence of viable parasites in meat (Kijlstra & Jongert, 2009). In particular, a recent study in cattle showed only a weak correlation between the modified agglutination assay which uses whole tachyzoites as antigenic source, and SAG1 immunoblotting. Furthermore, no correlation between serology and detection of *T. gondii* by either mouse bioassay and magnetic capture qPCR was observed, indicating that conventional serology is not a reliable indicator of the food risk (Opsteegh et al., 2019). A possible explanation for this could be the discrepancy between the antigen source used and the parasite stage sought. The reason serological tests rely on tachyzoite antigens is that this stage, which can be easily obtained in large quantities in *in vitro* cultures, has been shown to be more immunogenic than the chronic stage (Zhang et al., 1995), but recent studies questioned the lack of immunogenicity of the cyst (Roiko et al., 2018). Thus, the identification of BCLA has demonstrated the existence of bradyzoite-specific proteins with immunogenic potential (Dard et al., 2021). In the present study, this concept is supported by the identification of another protein that shares comparable immunogenic properties, namely BSM.

BSM was first described as DnAK-TPR, a cytoplasmic protein of bradyzoites that interacts with the p23 co-chaperone protein, suggesting a probable role in protein folding (Ueno et al., 2011). Another study shows that inactivation of the gene does not cause significant changes in the differentiation and development of bradyzoites (Yang et al., 2017). Here we have confirmed all their original observations and presented solid data on the previously unnoticed immunogenicity of this protein. This last feature is also relatively surprising because, unlike BCLA, which is localized on the surface of the cyst, BSM is localized inside the bradyzoite, theoretically limiting its presentation to the immune system. This unusual location for a candidate serological marker, a feature one would intuitively look for more in a surface or export protein, suggests that only an approach based indiscriminately on the whole bradyzoite proteome could bring BSM to light. On the other hand, this different localization of BSM and BCLA could also explain some of the discrepancies in serological responses. It is conceivable that the BCLA antigen is presented more consistently once the cyst wall has fully formed. BSM immunogenicity on the other hand relies on the exposure of the bradyzoite cytoplasmic contents, which requires a prior step of destruction of the cyst wall and lysis of individual bradyzoites.

Although the context of such exposure might be interesting from a pathophysiological point of view and remains to be explored, BSM serology correlates perfectly with the presence of parasitic DNA in the brain of chronically infected mice. It would be appropriate to apply this bradyzoite serology to any study of *T. gondii* biology in mouse models to detect cysts without killing the animals, such as in longitudinal studies. In this way, the number of animals could be significantly reduced, which is an important ethical aspect to consider in our protocols. The value of bradyzoite serology still needs to be evaluated in other models, such as livestock, by asking whether bradyzoite

serology reflects the infectivity of meat intended for consumption. If this is the case, it would open a great opportunity for the development of a "Toxoplasma-free" meat production sector. Furthermore, strongly reactive anti-bradyzoite antibodies targeting BSM or BCLA could be characterized and produced to potentially directly detect cysts within meat samples.

However, the results of bradyzoite ELISA serologies in humans are more nuanced. Patients found to have long-lasting immunity by conventional tachyzoite serology have higher bradyzoite and cyst-serology titers than the cohort of *T. gondii*-negative individuals. However, the wide variation in results in both groups raises concern about the significance of positive bradyzoite serology in conventionally seronegative individuals or, conversely, negative bradyzoite serology in individuals infected with *T. gondii* during their lifetime. While there is no evidence that cysts systematically persist throughout life in all previously infected individuals, bradyzoite serology in humans is clearly not fully sensitive, as in a limited cohort of patients with clinical forms known to be associated with the presence of cysts, not all were positive, although conventional serology was positive.

Here, we also assessed the value of bradyzoite serology to distinguish between recent and past infection, which would be useful in the context of pregnancy because only *T. gondii* infection during pregnancy - or in rare cases in the few months preceding it (Chemla et al., 2002; Villena et al., 1998) - carries the risk of congenital toxoplasmosis. BCLA serology and even more so the combined score, but not BSM serology, show higher rates in chronic infections. This is a particularly promising feature of bradyzoite serology. The kinetics of cystogenesis in humans are poorly understood. More than half of patients in the "past infection" group (51.7%) had a combined value above the threshold, suggesting that anti-bradyzoite antibodies appear mainly after three months

postinfection. However, 10.3% of patients in the "recently infected" group, also had a positive combined score, which could be explained by a relative earliness of bradyzoite antigens. Indeed, in mice, bradyzoite formation was observed as early as one day postinfection, whereas cyst development occurred 12 to 16 days postinfection (Di Cristina et al., 2008).

It must be remembered that the interpretation in humans is complicated by the fact there is no reference method that guarantees the presence of cysts. It is difficult to reconcile the imprecision of the method with the unexplored aspects of cystogenesis. However, while latent *T. gondii* infection has been identified as a factor that can alter rodent behavior (Boillat et al., 2020; Dupont et al., 2021), an impact on humans is also discussed in the literature through conflicting studies. The use of diagnostic tools such as bradyzoite serology, which focus more on the study of latent infection, may offer a way to resolve the controversy.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and human cell culture

Human primary fibroblasts (HFFs, ATCC® CCL-171™) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen), 10 mM (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid) (HEPES) buffer pH 7.2, 2 mM L-glutamine, and 50 µg/mL of penicillin and streptomycin (Invitrogen). Cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂. The *Toxoplasma* strains used in this study and listed in table 2. were maintained *in vitro* by serial passage on monolayers of HFFs.

Reagents

The following primary antibodies were used in the immunofluorescence, and immunoblotting assays: rabbit anti-TgHDAC3 (RRID: AB_2713903), mouse anti-TgBAG1, mouse anti-HA tag (Roche, RRID: AB_2314622), anti-QRS (van Rooyen JM et al. 2014), rabbit anti-BCLA (Dard et al., 2021). Immunofluorescence secondary antibodies were coupled with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific). Secondary antibodies used in Western blotting were conjugated to alkaline phosphatase (Promega). We also commissioned Eurogentec to produce polyclonal serum from rabbits immunized against the full-length BSM recombinant protein and used it for immunofluorescence and immunoblotting assays.

Mouse infection and experimental survey

Six-week-old NMRI, CD1 or Balb/C mice were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). Mouse care and experimental procedures were performed under pathogen-free conditions in accordance with established institutional guidance and approved protocols from the Institutional Animal Care and Use Committee of the University Grenoble Alpes (APAFIS#4536-2016031 017075121 v5). Female mice were used for all studies. For intraperitoneal (i.p.) infection; tachyzoites were grown in vitro and extracted from host cells by passage through a 27-gauge needle, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), and quantified with a hemocytometer. Parasites were diluted in Hank's Balanced Salt Solution (Life), and mice were inoculated by the i.p. route with tachyzoites of each strain (in 200 µl volume) using a 28-gauge needle. Blood was collected by intracardiac puncture when the mice were euthanized. Animal euthanasia was completed in an approved CO₂ chamber. For immunolabeling on histological sections of the brains, the brains were removed from mice, entirely embedded in a paraffin wax block and cut in 5-µm-thick layers using

494 microtome. For statistical analysis of mouse survival data, the Mantel-Cox and Gehan-
495 Breslow-Wilcoxon tests were used.

496 **Auxin-induced degradation**

497 Depletion of MORC-mAID-HA was achieved with 3-indoleacetic acid (IAA, Sigma-
498 Aldrich # 45533) used at 500 μ M final concentration from a 500-mM stock solution
499 prepared in EtOH, as described by Farhat et al., 2020 (Farhat et al., 2020). To monitor
500 the degradation of AID-tagged proteins, parasites grown in HFF monolayers were
501 treated with auxin for 24 to 48h at 37 °C before parasites were harvested and analyzed
502 by immunofluorescence or Western blotting.

503 **HDAC3 inhibition using FR235222**

504 FR235222 was provided by Astellas Pharma Inc. (Osaka, Japan) and dissolved into
505 DMSO, and the final concentration in the culture medium was 50 ng/mL. Fifteen hours
506 after infection of HFF monolayers, FR235222 was added to the medium and cells
507 cultivated for 48h.

508 **Immunofluorescence microscopy**

509 *T. gondii*-infected HFF monolayers grown on coverslips were fixed in 3% formaldehyde
510 for 20 min at room temperature, permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100 for 15 min,
511 and blocked in PBS containing 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA). For
512 immunolabeling on histological sections of the brains, the brain layers spotted on glass
513 slides were first solvent-dewaxed using toluene for 3 times 10 min and absolute alcohol
514 for 3 times 10 min. The slides were then treated with citrate buffer pH 6, heated at
515 100 °C during 1 h, rinsed extensively with water and blocked in PBS containing 3%
516 (v/v) BSA. The infected cells or brain layers were then incubated for 1 h with the primary
517 antibodies indicated in the figures followed by the addition of secondary antibodies

conjugated to Alexa Fluor 488 or 594 (Molecular Probes) at a 1:1000 dilution for 1 h. The nuclei of both host cells and parasites were stained for 10 min at room temperature with Hoechst 33258 at 2 µg/mL in PBS. After four washes in PBS, coverslips were mounted on a glass slide with Mowiol mounting medium; images were acquired with a fluorescence ZEISS ApoTome.2 microscope and processed with the ZEN software (Zeiss).

Western blot

Immunoblot analysis of protein was performed as followed: ~ 10⁷ cells were lysed in 50 µl lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.5% SDS [v/v], 10% glycerol [v/v], and 1 mM EDTA and protease inhibitors cocktail) and sonicated. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF, Immobilon-P; EMD Millipore) by liquid transfer 2h at 110 V; blotted membranes were then probed using appropriate primary antibodies followed by alkaline phosphatase secondary antibodies (Life technologies). Band revelation was detected using NBT-BCIP (Amresco).

Cyst observation

Fifty-nine days post-infection, the brain of each of the recipient mouse was homogenized in 2 mL of PBS. Images of cysts were acquired between slide and slip cover with a fluorescence ZEISS ApoTome.2 microscope.

Plaque assays

Confluent HFFs were infected with freshly egressed tachyzoites. Cultures were grown at 37°C for 7 days, fixed, and stained with Coomassie blue staining solution (0.1% Coomassie R-250 in 40% ethanol and 10% acetic acid). The size of the plaques was

measured using ZEN 2 lite 9 software (Carl Zeiss, Inc.) and plotted using GraphPad Prism 8.

Quantitative PCR

The parasite loads in the brain were quantified following DNA extraction (QiAmp DNA mini kit, Qiagen) using the quantitative PCR targeting of the *Toxoplasma*-specific 529-bp repeat element (Reischl et al., 2003). For statistical analysis of parasitic load differences between mice infected with 76K-GFP-luc and 76K-GFP-luc- Δbsm , the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was applied.

Quantitative RT-PCR analysis of interleukins in the brain

Total RNA was isolated from brains using TRIzol (Thermo Fisher Scientific). First-strand cDNA was reverse transcribed from 50-100 ng small RNA using TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) and TaqMan probes (Applied Biosystems) for miR-155 (ID 002623), miR-146a (ID 000468). Quantitative PCR analyses of miRNAs were performed using Taqman miRNA expression (Applied Biosystems) assays according to the manufacturer's protocols in the ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). Murine U6 snRNA/RNU6B (ID 001093) and RNU24 (ID 001001) were used as endogenous controls for normalization. Relative quantities of miRNA were analyzed by using the delta Ct method (Livak & Schmittgen, 2001).

***Toxoplasma gondii* transfection**

T. gondii strains were electroporated with vectors in cytomix buffer (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.6, 25 mM HEPES pH 7.6, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂) using a BTX ECM 630 machine (Harvard Apparatus). Electroporation was performed in a 2 mm cuvette at 1.100 V, 25 Ω and 25 μ F. Drug selection was

performed using pyrimethamine (3 μ M). Single-clone of stable transgenic tachyzoites were obtained by limiting dilution in 96-well plates and verified by immunofluorescence assay or genomic analysis.

Plasmid construction

The plasmids and primers for the genes of interest (GOI) used in this work are listed below. To construct the vector pLIC-GOI-HAFlag, the coding sequence of GOI was amplified using primers LIC-GOI-Fwd and LIC-GOI-Rev using *T. gondii* genomic DNA as template. The resulting PCR product was cloned into the pLIC-HF-dhfr vector using the ligation-independent cloning (LIC) cloning method (Bougdour et al., 2013, p. 16).

For BSM disruption, the plasmid pTOXO_Cas9-CRISPR was described previously (Sangaré et al., 2016). Twenty mer-oligonucleotides corresponding BSM were cloned using the Golden Gate strategy. Briefly, primers BSM-gRNA-Fwd and BSM-gRNA-Rev containing the sgRNA targeting BSM genomic sequence were phosphorylated, annealed, and ligated into the pTOXO_Cas9-CRISPR plasmid linearized with BsaI, leading to pTOXO_Cas9-CRISPR::sgBSM.

Gene synthesis for recombinant expression of *Tg*BSM

Gene synthesis for insect cell codon optimized constructs was provided by Genscript. The original *T. gondii* *Tg*BSM construct (aa 1-763) was designed with a non-cleavable C-terminal 6His tag. The *Tg*BCLA construct consisted of a 686 amino acid sequence designed to cover the N-terminal part followed by a conserved repetition, a degenerated repetition, and the C-terminal part of the BCLA protein encoded by TGME49_209755. The construct was also flanked by a C-terminal non-cleavable 6His tag. Both constructs were separately cloned between BamHI and HindIII sites into the pFastBac1 vector (Invitrogen).

Generation of baculovirus

For both BSM and BCLA, bacmid cloning steps and baculovirus generation were performed using EMBacY baculovirus (kindly gifted by Imre Berger), which contains a YFP reporter gene in the virus backbone. The established standard cloning and transfection protocols setup within the EMBL Grenoble eukaryotic expression facility were used. Baculovirus synthesis (V0) and amplification (to V1) were performed with SF21 cells cultured in ESF921 media (Expression system), large-scale expression cultures were performed with Hi-5 cells cultured in ESF921 media (Expression system) and infected with 0,5% vol/vol of generation 2 (V1) baculovirus suspensions and harvested 72h post-infection.

Protein expression and purification

BSM. For purification, the cell pellets of approximately 900 mL of Hi-5 culture were resuspended in 40 mL of lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl and 4 mM β -mercaptoethanol (β -ME)) in the presence of an anti-protease cocktail (Complete EDTA free, Roche) and 1 μ L benzonase (MERK Millipore 70746). Lysis was performed on ice by sonication for 3 min (30 sec on/ 30 sec off, 45° amplitude). After the lysis step, 5% of glycerol was added. Clarification was then performed by centrifugation for 1h at 12,000 xg and 4°C. Twenty mM imidazole was then added to the supernatant and incubated with 3 mL of Ni-NTA resin (Qiagen) with a stirring magnet at 4°C for 30 min. All further purification steps were then performed at room temperature. After flowing through the lysate, the resin was washed with 10 column volumes of lysis buffer containing 20 mM imidazole. Elution was then performed by increasing the imidazole content to 300 mM in a buffer system containing 200 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 2 mM BME and 5% glycerol. Eluted fractions were pooled based on an SDS PAGE gel analysis and flown directly through a previously equilibrated (in 250 mM NaCl, 50 mM

Tris pH 7.5, 2 mM BME and 5% glycerol) S200 column connected to an AKTA© pure system. Peak fractions were pooled and concentrated using a 50 kDa Amicon ultra (Sigma Aldrich) concentrator. Glycerol concentration was adjusted to 20% before being frozen in liquid nitrogen and stored long-term at -80°C.

BCLA. The protein expression, cell lysis and Ni-NTA purification processes were identical for BCLA and BSM. After Ni-NTA purification, BCLA eluted fractions were pooled and dialyzed overnight in 50 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 2 mM BME and 5% glycerol before injection on a Mono-Q column (GE healthcare) preequilibrated with the same buffer as for dialysis. The column was eluted by a salt gradient (50 mM to 2 M NaCl) and peak fractions were pooled and injected on an S200 column as mentioned above for BSM.

SEC-MALLS

The MALLS run was performed using an S200 Increase SEC column (10/300 GL, GE Healthcare). Sample injection and buffer flow were controlled by a Hitachi L2130 pump. The SEC column was followed by an L-2400 UV detector (Hitachi), an Optilab T-rEX refractometer (Wyatt technologies), and a DAWN HELEOS-II multi-angle light scattering detector (Wyatt technologies). Injections of 50 µL were performed using protein samples concentrated at a minimum of 4 mg.mL⁻¹, a constant flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ was used. Accurate MALLS mass prediction was performed with the Astra software (Wyatt Technologies). The curve was plotted using Graphpad (Prism).

Plate preparation

Midisorp plates (Nunc) were coated overnight (O.N) at 4 °C with either recombinant BSM or BCLA at 2 µg/mL in 100 mM calcium carbonate buffer pH 9.6 with 100 µl per well. After coating, plates were washed twice with 250 µl of DPBS 0.05% Tween 20

(DPBS/Tween) then blocked for at least 2 h with 300 µl Superblock blocking buffer (Thermo Fisher) after which the buffer was removed and the plates dried upside down. Once dried, the plates could be stored for extended periods of time at 4 °C with no loss in serological reactivity.

Sample preparation

All serum dilutions were prepared in DPBS 0.05% Tween 20, 0.1% BSA no more than 2 h prior to the assay. For mouse tested sera, 1:400 dilutions were prepared. Eleven standards were also freshly prepared, consisting of 10 serial dilutions of a positive frozen stock serum set at 100 UI. Starting at a dilution 1:200 and following a $\frac{3}{4}$ dilution increment, the following titration points were prepared: 200 UI (1:200), 150 UI (1:266), 112.5 UI (1:356), 84.4 UI (1:474), 63.3 UI (1:632), 47.5 UI, (1:843) 35.6 UI (1:1124), 26.7 UI (1:1498), 20 UI (1:1998), and 15 UI (1:2663). A 0 UI standard was prepared with a seronegative serum diluted at 1:400. For BCLA serology in humans, 1:400 sera dilutions were prepared. Six standards were also freshly prepared, consisting of five serial dilutions of an anti-His-tag chimeric human monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). The following titration points were prepared: 200 UI, 100 UI, 50 UI, 25 UI, 12.5 UI. A 0 UI standard was prepared with a seronegative serum diluted at 1:400. For BSM serology in humans, sera were diluted at 1:200. Ten standards were also freshly prepared, consisting of nine serial dilutions of an anti-His-tag chimeric human monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). The following titration points were prepared: 100 UI, 66.67 UI, 44.44 UI, 29.63 UI, 19.75 UI, 13.17 UI, 8.78 UI, 5.85 UI, 3.9 UI. A 0 UI standard was prepared with a dilution buffer only. The reactivity of a sample prepared with a dilution of anti-His-tag chimeric human monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) at 10 UI was measured in each

ELISA plate. BSM serology was calculated for each sample as the ratio between its own optical density (OD) and the OD of the cutoff from the same plate.

Assay

All the subsequent steps were implemented on the Gemini ELISA automation platform (Stratec). Dried plates were first washed twice with 350 μ l of DPBS/Tween. Dilutions of the tested sera and standards were then distributed in the plates as row duplicates with 100 μ l per well. Plates were then incubated 1h at RT. After the incubation period, plates were washed 4 times with 350 μ l of DPBS/Tween, 100 μ l of peroxidase coupled secondary antibody dilution (1:50,000 anti-mouse IgG or 1:60,000 anti-human IgG, Sigma Aldrich ref A0168 and A0170 respectively) in DPBS 0.05% Tween 20, 0.1% BSA were then rapidly distributed in all wells. For human BSM serology, purified recombinant protein A/G peroxidase conjugated (ThermoScientific) stored at -20°C at 87Units/mL was used diluted at 1:50,000 instead of anti-human IgG. After 1h at RT, plates were washed 4 times in DPBS-Tween. Revelation reaction was performed by adding 100 μ l of TMB Substrate (Thermo Fisher ref 34029) for 20 min precisely at RT then stopping the reaction with 50 μ l of H₂SO₄ 0.2 M followed by 30 s of mixing. Well absorbance measurement was then performed using the Gemini integrated spectrophotometer at 450 nm.

Data treatment

Blank subtractions were performed on duplicate blank wells for which where primary antibody/sera were omitted but treated similarly as the others for all subsequent steps (washes, secondary Ab, substrate). Standard serum dilutions were averaged and fitted with a 4-parameter logistic regression with the upper asymptote value (D_i) fixed at 2.5 AU and all other variables (A_i , B_i , C_i) allowed to fit. For mouse and human BCLA serology and BSM mouse serology, tested dilution duplicates could have their

apparent UI calculated and averaged from this regression; if in a duplicate measurement the coefficient of variation was observed above 20%, then the sample would be re-tested. All the ELISA data presented in this work was obtained several times in independent titrations.

Human sera

This non-interventional, monocentric, retrospective study involving data and samples from human participants has been carried out in the Grenoble Alpes University Hospital according to French current regulation. The principal investigator (Dr Marie-Pierre Brenier-Pinchart, MD, PhD) has signed a commitment to comply with Reference Methodology n°MR004 issued by French Authorities (CNIL). Subjects were all informed and did not oppose; written consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors within respect of General Data Protection Regulation, without undue reservation.

All the sera were collected among sera received at our laboratory for toxoplasmosis serological routine analysis between December 1, 2011, and February 1, 2022, in agreement with the institution and after patients' information and non-objection. Clinical data (age, sex, clinical and immune context) were collected and stored according to local ethic procedures. The analyses with Vidas® Toxo IgM and IgG (bioMérieux, France) and Architect Toxo IgG and IgM (Abbott, Germany) were performed in the Parasitology-Mycology Clinical Laboratory of Grenoble Alpes University Hospital. Briefly, the antibody titers for IgG were quantitatively expressed in IU/mL whereas IgM were expressed as an index. The cutoffs defined by Vidas®, bioMérieux manufacturer were as follows: (i) IgG (IU/mL): negative < 4.0 ; $4.0 \leq$ equivocal (gray zone) < 8 ; ≥ 8 positive; (ii) IgM (index): negative < 0.55 ; $0.55 \leq$ equivocal (gray zone) < 0.65 ; ≥ 0.65

positive. The cutoffs defined by Architect®, Abbott manufacturer were as follows: (i) IgG (IU/mL): negative < 1.6 ; $1.6 \leq$ equivocal (gray zone) < 3.0 ; ≥ 3.0 positive; (ii) IgM (index): negative < 0.50 ; $0.50 \leq$ equivocal (gray zone) < 0.60 ; ≥ 0.60 positive. BCLA and BSM titers were measured on 142 selected patients' sera corresponding to two different serological status for toxoplasmosis: non-immunized patients against toxoplasmosis (seronegative, $n = 55$) and patients with past immunity (chronic toxoplasmosis, $n = 87$). Among the patients with past immunity, those with a clinical context related primarily to reactivation from cysts were categorized into the subgroups "proven ocular toxoplasmosis" ($n = 23$) "cerebral toxoplasmosis" ($n = 5$) and "asymptomatic reactivation" ($n = 6$). In addition, 87 sera from consecutive samples collected from 25 pregnant women who seroconverted during pregnancy were used to establish the kinetics of anti-bradyzoite serology. Of these precisely dated sera, 58 were collected within three months of infection and were assigned to the category "recent infection". The absence of *T. gondii* immunity was concluded when the IgM- and IgG-specific antibody levels measured using Architect Toxo® IgG and Toxo® IgM assays were negative. Past immunity was considered when IgG were above the threshold of positivity with at least one method, and the IgM were negative or weakly positive (Architect® and Vidas®). Proven ocular toxoplasmosis (OT) was confirmed by detection of either *Toxoplasma* DNA using PCR and/or a local production of IgG and/or IgA antibodies by Western blot (LDBIO Diagnostics, Lyon, France) (Greigert et al., 2019). Cerebral toxoplasmosis was diagnosed by PCR in cerebrospinal fluid in immunocompromised patients presenting acquired immunodeficiency syndrome (Brenier-Pinchart et al., 2022). These patients had clinical symptoms and radiological evidence of active disease. Asymptomatic serological reactivations were observed in immunocompromised patients during the serological follow-up (Dard et al., 2018;

Robert-Gangneux et al., 2018). In these patients, an increase of IgG levels compared to previous serological results were observed; furthermore, the *Toxoplasma*-PCR performed were negative, and these patients did not develop any clinical signs of toxoplasmosis (Fricker-Hidalgo et al., 2009). Seroconversion during pregnancy was objectified by the appearance of anti-*Toxoplasma* antibodies or by a significant increase in IgG levels between 2 consecutive sera (Villard et al., 2016).

REFERENCES

- Ben-Harari, R. R., & Connolly, M. P. (2019). High burden and low awareness of toxoplasmosis in the United States. *Postgraduate Medicine*, 131(2), 103-108. <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1568792>
- Bigna, J. J., Tochie, J. N., Tounouga, D. N., Bekolo, A. O., Ymele, N. S., Youda, E. L., Sime, P. S., & Nansseu, J. R. (2020). Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women : A systematic review, modelling and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10, 12102. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69078-9>
- Boillat, M., Hammoudi, P.-M., Dogga, S. K., Pagès, S., Goubran, M., Rodriguez, I., & Soldati-Favre, D. (2020). Neuroinflammation-Associated Aspecific Manipulation of Mouse Predator Fear by *Toxoplasma gondii*. *Cell Reports*, 30(2), 320-334.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.019>
- Bougdour, A., Durandau, E., Brenier-Pinchart, M.-P., Ortet, P., Barakat, M., Kieffer, S., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R.-L., Bastien, O., Coute, Y., Pelloux, H., & Hakimi, M.-A. (2013). Host Cell Subversion by *Toxoplasma* GRA16, an Exported Dense Granule Protein that Targets the Host Cell Nucleus and Alters Gene Expression. *Cell Host & Microbe*, 13(4), 489-500. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002>
- Bouwknegt, M., Devleesschauwer, B., Graham, H., Robertson, L. J., Giessen, J. W. van der, & Participants, the E.-F. workshop. (2018). Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance*, 23(9), 17. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161>
- Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Hammoudi, P.-M., Cannella, D., Kieffer-Jaquinod, S., Voltaire, J., Josserand, V., Touquet, B., Couté, Y., Tardieux, I., Bougdour, A., & Hakimi, M.-A. (2019). The *Toxoplasma* effector TEEGR promotes parasite persistence by modulating NF- κ B signalling via EZH2. *Nature Microbiology*, 4(7), 1208-1220. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0431-8>
- Brenier-Pinchart, M.-P., Filisetti, D., Cassaing, S., Varlet-Marie, E., Robert-Gangneux, F., Delhaes, L., Guitard, J., Yéra, H., Bastien, P., Pelloux, H., & Sterkers, Y. (2022). Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis : Multicenter Evaluation of the *Toxoplasma*

772 RealCycler Universal PCR Assay on 168 Characterized Human Samples. *The Journal*
773 *of Molecular Diagnostics*, 24(6), 687-696. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.03.009>

774 Burrells, A., Opsteegh, M., Pollock, K. G., Alexander, C. L., Chatterton, J., Evans, R.,
775 Walker, R., McKenzie, C.-A., Hill, D., Innes, E. A., & Katzer, F. (2016). The prevalence
776 and genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* from individuals in Scotland, 2006–2012.
777 *Parasites & Vectors*, 9(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1610-6>

778 Cannella, D., Brenier-Pinchart, M.-P., Braun, L., van Rooyen, J. M., Bougdour, A.,
779 Bastien, O., Behnke, M. S., Curt, R.-L., Curt, A., Saeij, J. P. J., Sibley, L. D., Pelloux,
780 H., & Hakimi, M.-A. (2014). MiR-146a and miR-155 delineate a microRNA fingerprint
781 associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell reports*, 6(5), 928-937.
782 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.002>

783 Cantey, P. T., Montgomery, S. P., & Straily, A. (2021). Neglected Parasitic Infections :
784 What Family Physicians Need to Know—A CDC Update. *American Family Physician*,
785 104(2), 277-287.

786 Chambers, A. C., Aksular, M., Graves, L. P., Irons, S. L., Possee, R. D., & King, L. A.
787 (2018). Overview of the Baculovirus Expression System. *Current Protocols in Protein*
788 *Science*, 91(1). <https://doi.org/10.1002/cpp.47>

789 Chemla, C., Villena, I., Aubert, D., Hornoy, P., Dupouy, D., Leroux, B., Bory, J. P., &
790 Pinon, J. M. (2002). Preconception Seroconversion and Maternal Seronegativity at
791 Delivery Do Not Rule Out the Risk of Congenital Toxoplasmosis. *Clinical and Vaccine*
792 *Immunology*, 9(2), 489-490. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.2.489-490.2002>

793 Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P., & Pelloux, H. (2016). Relevance
794 of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends in Parasitology*,
795 32(6), 492-506. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>

796 Dard, C., Marty, P., Brenier-Pinchart, M.-P., Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H., Pelloux,
797 H., & Pomares, C. (2018). Management of toxoplasmosis in transplant recipients : An
798 update. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(6), 447-460.
799 <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1483721>

800 Dard, C., Swale, C., Brenier-Pinchart, M.-P., Farhat, D. C., Bellini, V., Robert, M. G.,
801 Cannella, D., Pelloux, H., Tardieux, I., & Hakimi, M.-A. (2021). A brain cyst load-
802 associated antigen is a *Toxoplasma gondii* biomarker for serodetection of persistent
803 parasites and chronic infection. *BMC Biology*, 19(1), 25.
804 <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00959-9>

805 Delair, E., Monnet, D., Grabar, S., Dupouy-Camet, J., Yera, H., & Brézin, A. P. (2008).
806 Respective Roles of Acquired and Congenital Infections in Presumed Ocular
807 Toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, 146(6), 851-855.
808 <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.06.027>

809 Di Cristina, M., Marocco, D., Galizi, R., Proietti, C., Spaccapelo, R., & Crisanti, A.
810 (2008). Temporal and Spatial Distribution of *Toxoplasma gondii* Differentiation into

811 Bradyzoites and Tissue Cyst Formation In Vivo. *Infection and Immunity*, 76(8),
812 3491-3501. <https://doi.org/10.1128/IAI.00254-08>

813 Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii*
814 Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue
815 Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267-299.

816 Dupont, D., Lin, J.-S., Peyron, F., Akaoka, H., & Wallon, M. (2021). Chronic
817 *Toxoplasma gondii* infection and sleep-wake alterations in mice. *CNS Neuroscience &*
818 *Therapeutics*, 27(8), 895-907. <https://doi.org/10.1111/cns.13650>

819 Farhat, D. C., Swale, C., Dard, C., Cannella, D., Ortet, P., Barakat, M., Sindikubwabo,
820 F., Belmudes, L., De Bock, P.-J., Couté, Y., Bougdour, A., & Hakimi, M.-A. (2020). A
821 MORC-driven transcriptional switch controls *Toxoplasma* developmental trajectories
822 and sexual commitment. *Nature microbiology*, 5(4), 570-583.
823 <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0674-4>

824 Fricker-Hidalgo, H., Bulabois, C.-E., Brenier-Pinchart, M.-P., Hamidfar, R., Garban, F.,
825 Brion, J.-P., Timsit, J.-F., Cahn, J.-Y., & Pelloux, H. (2009). Diagnosis of
826 Toxoplasmosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation : Results of DNA Detection
827 and Serological Techniques. *Clinical Infectious Diseases*, 48(2), e9-e15.
828 <https://doi.org/10.1086/595709>

829 Fricker-Hidalgo, H., Cimon, B., Chemla, C., Darde, M. L., Delhaes, L., L'Ollivier, C.,
830 Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Quinio, D., Robert-Gangneux, F., Villard, O.,
831 Villena, I., Candolfi, E., & Pelloux, H. (2013). *Toxoplasma* Seroconversion with
832 Negative or Transient Immunoglobulin M in Pregnant Women : Myth or Reality ? A
833 French Multicenter Retrospective Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7),
834 2103-2111. <https://doi.org/10.1128/JCM.00169-13>

835 Furtado, J. M., Winthrop, K. L., Butler, N. J., & Smith, J. R. (2013). Ocular
836 toxoplasmosis I : Parasitology, epidemiology and public health. *Clinical & Experimental*
837 *Ophthalmology*, 41(1), 82-94. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2012.02821.x>

838 Gay, G., Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Vollaie, J., Josserand, V., Bertini, R.-L.,
839 Varesano, A., Touquet, B., De Bock, P.-J., Coute, Y., Tardieux, I., Bougdour, A., &
840 Hakimi, M.-A. (2016). *Toxoplasma gondii* TglST co-opts host chromatin repressors
841 dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses.
842 *Journal of Experimental Medicine*, 213(9), 1779-1798.
843 <https://doi.org/10.1084/jem.20160340>

844 Gras, L., Gilbert, R. E., Wallon, M., Peyron, F., & Cortina-Borja, M. (2004). Duration of
845 the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy :
846 Implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiology*
847 *and Infection*, 132(3), 541-548.

848 Greigert, V., Pfaff, A. W., Sauer, A., Filisetti, D., Candolfi, E., & Villard, O. (2019).
849 Biological Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis : A Nine-Year Retrospective
850 Observational Study. *MSphere*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00636-19>

851 Hanley, J. A., & McNeil, B. J. (1983). A method of comparing the areas under receiver
852 operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*, 148(3),
853 839-843.

854 Johnson, H. J., & Koshy, A. A. (2020). Latent Toxoplasmosis Effects on Rodents and
855 Humans : How Much is Real and How Much is Media Hype? *MBio*, 11(2), e02164-19.
856 <https://doi.org/10.1128/mBio.02164-19>

857 Kempen, M. van, Kim, S. S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Gilchrist, C. L. M., Söding,
858 J., & Steinegger, M. (2022). *Foldseek : Fast and accurate protein structure search* (p.
859 2022.02.07.479398). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.02.07.479398>

860 Kijlstra, A., & Jongert, E. (2009). *Toxoplasma*-safe meat : Close to reality? *Trends in*
861 *Parasitology*, 25(1), 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.008>

862 Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for
863 Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159-174. <https://doi.org/10.2307/2529310>

864 Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data
865 Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4),
866 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

867 Milligan-Myhre, K., Wilson, S. K., & Knoll, L. J. (2016). Developmental change in
868 translation initiation alters the localization of a common microbial protein necessary for
869 *Toxoplasma* chronic infection. *Molecular Microbiology*, 102(6), 1086-1098.
870 <https://doi.org/10.1111/mmi.13538>

871 Opsteegh, M., Spano, F., Aubert, D., Balea, A., Burrells, A., Cherchi, S., Cornelissen,
872 J. B. W. J., Dam-Deisz, C., Guitian, J., Györke, A., Innes, E. A., Katzer, F., Limon, G.,
873 Possenti, A., Pozio, E., Schares, G., Villena, I., Wisselink, H. J., & van der Giessen, J.
874 W. B. (2019). The relationship between the presence of antibodies and direct detection
875 of *Toxoplasma gondii* in slaughtered calves and cattle in four European countries.
876 *International Journal for Parasitology*, 49(7), 515-522.
877 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.01.005>

878 Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots : Global
879 status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and
880 congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385-1394.
881 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>

882 Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., & Costa, J.-M. (2003). Comparison
883 of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using
884 fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infectious*
885 *Diseases*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-3-7>

886 Robert, M. G., Brenier-Pinchart, M.-P., Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H., & Pelloux, H.
887 (2021). Molecular diagnosis of toxoplasmosis : Recent advances and a look to the
888 future. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 1-14.
889 <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1941867>

890 Robert-Gangneux, F., Meroni, V., Dupont, D., Botterel, F., Garcia, J. M. A., Brenier-
 891 Pinchart, M.-P., Accoceberry, I., Akan, H., Abbate, I., Boggian, K., Bruschi, F.,
 892 Carratalà, J., David, M., Drgona, L., Djurković-Djaković, O., Farinas, M. C., Genco, F.,
 893 Gkrania-Klotsas, E., Groll, A. H., ... Manuel, O. (2018). Toxoplasmosis in Transplant
 894 Recipients, Europe, 2010–2014. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1497-1504.
 895 <https://doi.org/10.3201/eid2408.180045>

896 Roiko, M. S., LaFavers, K., Leland, D., & Arrizabalaga, G. (2018). *Toxoplasma gondii*
 897 -positive human sera recognise intracellular tachyzoites and bradyzoites with diverse
 898 patterns of immunoreactivity. *International Journal for Parasitology*, 48(3-4), 225-232.
 899 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.08.016>

900 Rougier, S., Montoya, J. G., & Peyron, F. (2017). Lifelong Persistence of *Toxoplasma*
 901 Cysts: A Questionable Dogma? *Trends in Parasitology*, 33(2), 93-101.
 902 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.007>

903 Sangaré, L. O., Alayi, T. D., Westermann, B., Hovasse, A., Sindikubwabo, F.,
 904 Callebaut, I., Werkmeister, E., Lafont, F., Slomianny, C., Hakimi, M.-A., Van
 905 Dorsselaer, A., Schaeffer-Reiss, C., & Tomavo, S. (2016). Unconventional endosome-
 906 like compartment and retromer complex in *Toxoplasma gondii* govern parasite integrity
 907 and host infection. *Nature Communications*, 7(1), 11191.
 908 <https://doi.org/10.1038/ncomms11191>

909 Stelzer, S., Basso, W., Benavides Silván, J., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P.,
 910 Gethmann, J., Conraths, F. J., & Schares, G. (2019). *Toxoplasma gondii* infection and
 911 toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and*
 912 *Waterborne Parasitology*, 15, e00037. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>

913 Ueno, A., Dautu, G., Haga, K., Munyaka, B., Carmen, G., Kobayashi, Y., & Igarashi,
 914 M. (2011). *Toxoplasma gondii*: A bradyzoite-specific DnaK-tetratricopeptide repeat
 915 (DnaK-TPR) protein interacts with p23 co-chaperone protein. *Experimental*
 916 *Parasitology*, 127(4), 795-803. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.015>

917 van der Giessen, J., Deksne, G., Gómez-Morales, M. A., Troell, K., Gomes, J., Sotiraki,
 918 S., Rozycki, M., Kucsera, I., Djurković-Djaković, O., & Robertson, L. J. (2021).
 919 Surveillance of foodborne parasitic diseases in Europe in a One Health approach.
 920 *Parasite Epidemiology and Control*, 13, e00205.
 921 <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00205>

922 Villard, O., Cimon, B., L'Ollivier, C., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S.,
 923 Paris, L., Pelloux, H., Villena, I., & Candolfi, E. (2016). Serological diagnosis of
 924 *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference
 925 Center for Toxoplasmosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(1),
 926 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009>

927 Villena, I., Chemla, C., Quereux, C., Dupouy, D., Leroux, B., Foudrinier, F., & Pinon,
 928 J.-M. (1998). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an
 929 immunocompetent woman infected before conception. *Prenatal Diagnosis*, 18(10),

930 1079-1081. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(1998100\)18:10<1079::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(1998100)18:10<1079::AID-)
931 PD391>3.0.CO;2-E

932 Waldman, B. S., Schwarz, D., Wadsworth, M. H., Saeij, J. P., Shalek, A. K., & Lourido,
933 S. (2020). Identification of a Master Regulator of Differentiation in *Toxoplasma*. *Cell*,
934 S0092867419313753. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.013>

935 Watts, E., Zhao, Y., Dhara, A., Eller, B., Patwardhan, A., & Sinai, A. P. (2015). Novel
936 Approaches Reveal that *Toxoplasma gondii* Bradyzoites within Tissue Cysts Are
937 Dynamic and Replicating Entities In Vivo. *mBio*, 6(5).
938 <https://doi.org/10.1128/mBio.01155-15>

939 Yang, J., Zhang, L., Diao, H., Xia, N., Zhou, Y., Zhao, J., & Shen, B. (2017). ANK1 and
940 DnaK-TPR, Two Tetratricopeptide Repeat-Containing Proteins Primarily Expressed in
941 *Toxoplasma* Bradyzoites, Do Not Contribute to Bradyzoite Differentiation. *Frontiers in*
942 *Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02210>

943 Ybañez, R. H. D., Ybañez, A. P., & Nishikawa, Y. (2020). Review on the Current Trends
944 of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Frontiers in Cellular and Infection*
945 *Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00204>

946 Zhang, Y. W., Fraser, A., Balfour, A. H., Wreghitt, T. G., Gray, J. J., & Smith, J. E.
947 (1995). Serological reactivity against cyst and tachyzoite antigens of *Toxoplasma*
948 *gondii* determined by FAST-ELISA. *Journal of Clinical Pathology*, 48(10), 908-911.
949 <https://doi.org/10.1136/jcp.48.10.908>

950

951

Figure 1. Application of the MORC-mAID system for the identification of stage-specific immunogenic proteins

a. Western blotting on untreated and MORC knockdown (24h) extracts. MORC depletion in treated extracts was verified using anti-HA antibody, anti-QRS and anti-HDAC3 antibodies controlled the amounts deposited, and anti-BAG1 and anti-BCLA antibodies confirmed the expression of bradyzoite stage-specific proteins upon MORC depletion. **b.** Scheme of the purification steps. **c.** Western blot membranes prepared from auxin-treated and untreated extracts were subjected to antibody dilutions from different mice chronically infected with cystogenic strains of *T. gondii*. The experiment was repeated several times for each mouse. A representative western blot is shown here. **d.** Western blotting of purification steps and S200 fractions (S) probed with the serum of an NMRI mouse chronically infected with a 76K *Toxoplasma gondii* strain **e.** Silver staining analysis of fraction 17 of gel filtration chromatography with S200 column **f.** Protein extracts were fractionated by size exclusion chromatography and then loaded onto electrophoresis gel and transferred to western blot membranes subjected to sera from mice chronically infected or not infected with *T. gondii*. **g.** Bar graphs showing the expression (transcript per million [TPM] values) of TGME49_202020 and TGME49_216140 genes during: acute infection (10 days) or chronic infection (28 days) in mice, in various cat entero-epithelial stages (EES) samples (EES1: very early EES; EES2: early EES; EES3: mixed EES; EES4; late EES; EES5: very late EES) from day 3 to day 7 after oral infection with *T. gondii* cysts (data plotted on the left Y axis), in *in vitro* cultivated tachyzoites and cysts from mouse brain, in *in vitro* cultured PRU-MORC mAID or RH-MORC mAID tachyzoites untreated (UT) or treated with IAA (500 μ M) for 7, 24 or 48 hours, and in *in vitro* cultured PRU tachyzoites unstimulated (US) or treated

with FR235222 (FR) for 7 or 18h (data plotted on the right Y axis). Data source:
www.ToxoDB.org.

Figure 2. BSM is immunogenic.

a. The RH-MORC-mAID-HA strain was modified to produce BSM or the protein encoded by TGME49_216140 with a C-terminal HA-Flag motif. Expression was monitored by immunofluorescence performed on the lines cultured with auxin for 24h or without auxin, followed by joint staining with anti-HA and Hoechst antibodies. **b.** BSM and the protein encoded by TGME49_216140 were immunopurified with anti-Flag antibodies. The presence of the proteins was monitored by western blot using Flag motif labeling. Western blots loaded with each of the immunopurified proteins were also subjected to sera from chronically infected mice bearing *T. gondii* cysts. BSM was also subjected to sera from chronically infected mice lacking *T. gondii* cysts. **c.** AlphaFold model of the BSM protein (EBI/AlphaFold server) shown in cartoon fashion and colored from N-terminal blue to C-terminal red. **d.** AlphaFold position error heatmap maps the predicted subdomains of BSM.

Figure 3. BSM is localized in the cytoplasm of bradyzoites and *Bsm* deletion does not affect growth, virulence, or cyst morphology.

a. MORC-depleted (24h) parasites were grown *in vitro* and probed with antibodies against BSM (green) and with DBA lectin (left) or antibodies against BAG1 (right, red). **b.** Expression levels of BSM and BCLA of 76K WT or Δbsm strains were determined by IFA after inhibition of HDAC3 by FR235222. **c.** BSM was detected on a cyst within a histological section of brain of a mouse chronically infected with a type 2 strain (Pru).

d. Plaque assay representing the lytic cycle of 76K-GFP-luc and Δbsm parasites. Confluent HFFs were infected with 76K-GFP-luc or Δbsm strains. After 7 days, the cells were fixed and stained with Coomassie blue to detect the presence of plaques (left panel). Graphs on the right show the distribution of the size of visible plaques. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney test. **e.** NMRI (n = 15) mice were given 5.10^4 tachyzoites of the 76K-GFP-luc WT and Δbsm strains intraperitoneally and their survival was monitored. Significance was tested using log-rank Mantel–Cox and Gehan–Breslow–Wilcoxon tests (p = 0.3496). **f.** Morphological aspect of cysts in homogenized suspension of mouse brain infected with 76K-GFP-luc and Δbsm strains. More than twenty cysts were observed for each strain. Representative microscopy images are shown. **g.** Parasitic load in parasite per brain (qPCR count), **h.** miR-155, and miR-146a expression in mouse brain infected with 76K-GFP-luc and Δbsm strains. Statistical significance was calculated using a non-parametric Mann-Whitney test.

Figure 4. Recombinant BSM purification steps. **a.** Nickel-nitrilotriacetic (Ni-NTA) elution. SDS PAGE electrophoresis of total (T), soluble (S), flow through (Ft) and elution fractions 3 (E3) and 6 (E6). **b.** Size Exclusion Chromatography using a S200 (10/300 GI) combined to a Multi-Angle Laser Light Scattering analysis. Absorbance values are shown in deep blue while the predicted molecular weight plot (Mw) is displayed in light blue.

Figure 5. Bradyzoite-specific ELISA serologies correlate with parasite load in mouse brain. **a.** BSM ELISA serology in mice from different background (NMRI,

Balb/C, CD1) and infected by cystogenic strains (76K, ME49; red marks), low-cystogenic strains (CTG, Pru ku80; green marks), 76K Δbsm (blue triangles), 76K or Pru ku80 $\Delta bcla$ (purple marks). Statistical significance was calculated using a non-parametric Mann-Whitney test. **b.** Parasitic load in mice brain determined by qPCR count and displayed with the same color code as in panel **a.** **c.** BCLA ELISA serology in mice displayed with the same color code as in panel **a.** Statistical significance was calculated using a non-parametric Mann-Whitney test. **d.** ROC curves of BSM ELISA serology (blue curve) and BCLA ELISA serology (purple curve).

Figure 6. Bradyzoite-specific serology in human sera. BSM ELISA serology (**a**), BCLA ELISA serology (**b**) or combined score of bradyzoite serology (**c**) in seronegative (N = 55, green histogram) or previously immunized patients against *T. gondii* infection (N = 87, red histogram), and according to the clinical context (gray histograms). Statistical significance was calculated using a non-parametric Mann-Whitney test. **d.** ROC curves of BSM ELISA serology (blue curve), BCLA ELISA serology (purple curve) and combined score (black curve).

Figure 7. Bradyzoite serology in acute and past infection. BSM ELISA (**a**), BCLA ELISA (**b**) serology titers and combined score (**c**) in the course of acute (orange histogram) and past infection (pink histogram). Statistical significance was calculated using a non-parametric Mann-Whitney test.

1045 **Table 1.** Clinical contexts and *Toxoplasma* bradyzoite and conventional serologies for 13 patients presenting clinical contexts mainly
 1046 related to reactivation from cysts and with negative combined score.

	Gender	BCLA (UI/mL)	BSM (index)	Combined score	IgG Architect (UI/mL)	IgM Architect (index)	IgG Vidas (UI/mL)	IgM Vidas (index)	Toxoplasmosis status	Clinical context	Immune status	Underlying pathology
1	M	12.63	0.75	0.95	11.00	0.09	48	0.04	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	IC	
2	M	21.95	1.70	3.74	20.4	0.4	67	0.29	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	IC	
3	F	15.78	1.34	2.12	26.8	0.09	143	0.08	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	IC	
4	F	18.07	1.55	2.80	>2000	2.83	>300	4.86	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	ID	Allogeneic HSCT recipient
5	F	5.31	5.40	2.87	/		264	0.1	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	ID	Crohn's disease treated with azathioprine
6	M	0.00	1.03	0.00	11.2	0.04	30	0.02	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	IC	
7	M	2.54	0.44	0.11	89.4	0.15	181	0.05	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	ID	Chronic lymphocytic leukemia
8	F	10.98	0.74	0.81	>2000	1.77	>300	2.48	Chronic or acute infection	Ocular toxoplasmosis	ID	Rheumatoid arthritis treated with methotrexate
9	F	11.06	1.63	1.81	10.9	0.09	61	0.19	Chronic infection	Ocular toxoplasmosis	IC	
10	M	12.83	2.18	2.79	/		>300	0,1	Chronic infection	Cerebral toxoplasmosis	ID	AIDS
11	F	12.06	3.19	3.84	/		42	0,17	Chronic infection	Cerebral toxoplasmosis	ID	Allogeneic HSCT recipient
12	M	7.94	0.92	0.73	56.8	0.39	>300	0.08	Chronic infection	Asymptomatic reactivation	ID	Allogeneic HSCT recipient
13	F	1.32	0.87	0.11	4.10	0.08	9	0.04	Chronic infection	Asymptomatic reactivation	ID	Allogeneic HSCT recipient

1047 F, female; M, male; IC, immunocompetent; ID, immunodepressed. AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; HSCT, haematopoietic stem cell
 1048 transplantation.

1049 **Table 2.** List of *T. gondii* parasite lines used in this work.

<i>T. gondii</i> strains	Haplotype	Genotype	Reference or source
RHku80 MORC KD	I	RH <i>Dku80</i> , <i>OsTir1</i> -(Ty)3- <i>UPRT</i> (-), <i>MORC-mAID-HA-HX</i>	(Farhat et al., 2020)
Pruku80 MORC KD	II	Pru <i>Dku80</i> , <i>OsTir1</i> -(Ty)3- <i>UPRT</i> (-), <i>MORC-mAID-HA-HX</i>	(Farhat et al., 2020)
RHku80 MORC KD BSM HF	I	RH <i>Dku80</i> , <i>OsTir1</i> -(Ty)3- <i>UPRT</i> (-), <i>MORC-mAID-HA-HX</i> , <i>BSM-HA-Flag</i>	This study
RHku80 MORC KD TGME49_216140 HF	I	RH <i>Dku80</i> , <i>OsTir1</i> -(Ty)3- <i>UPRT</i> (-), <i>MORC-mAID-HA-HX</i> , <i>TGME49_216140-HA-Flag</i>	This study
76K-luc-GFP	II	76K strain - Luciferase / GFP	(Braun et al., 2019)
76K-luc-GFP <i>Dbcm</i>	II	76K strain - Luciferase / GFP, <i>Dbcm</i> , <i>dhfr</i> +	This study
ME49	II	ME49 FUDR ^R	(Braun et al., 2019)
CTG	III	CTG	(Cannella et al., 2014)
Pruku80	II	Prugnialud <i>Dku80</i> type II strain	(Braun et al., 2019)
Pruku80 <i>Dbcla</i>	II	Pruku80 <i>Dbcla</i> , <i>dhfr</i> +	(Dard et al., 2021)
76K-luc-GFP <i>Dbcla</i>	II	76K <i>Dbcla</i> , <i>dhfr</i> +	(Dard et al., 2021)

1050

1051 **Table 3.** List of plasmids used in this work.

Plasmid name	Description	Reference or source
pDHFR-TSc3	Confers resistance to Pyrimethamine	(Braun et al., 2019)
pLIC-HF- <i>dhfr</i>	Amp ^R , Pyrimethamine ^R ,HA-Flag tag, <i>DHFR</i>	(Braun et al., 2019)
pTOXO_Cas9-CRISPR	pUC57/pTgTUB8-TgU6-Cas9-HA-YFP	(Gay et al., 2016)
pTOXO_Cas9-CRISPR::sgBSM	pTOXO_Cas9-CRISP/sgBSM	This study
pLIC-BSM-HF	pLIC-bsm- <i>HA-Flag-dhfr</i>	This study
pLIC-TGME49_216140-HF	pLIC-TGME49_216140- <i>HA-Flag-dhfr</i>	This study

1052

1053 **Table 4.** List of primers used in this work.

Primer name	Cloning	Primer sequence 5' to 3'
LIC-216140-Fwd	pLIC	TACTTCCAATCCAATTTAGCtccgaagaccatccatgaatattcatgg
LIC-216140-Rev	pLIC	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCgccgtttatctcgaccacggatggcgg
LIC-BSM-Fwd	pLIC	TACTTCCAATCCAATTTAGCgatgaattacccacagtgtgtggac
LIC-BSM-Rev	pLIC	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCagctgtgtgagaatgctgccgctcgg
BSM-CRISP1-Fwd	CRISPR-Cas9	AAGTTGATGATACTCACTGCAGCTCG
BSM-CRISP1-Rev	CRISPR-Cas9	AAAACGAGCTGCAGTGAGTATCATCA
BSM-REV1-screen		GAGCTGCAGTGAGTATCATC
BSM-CRISP2-Fwd	CRISPR-Cas9	AAGTTGGAGGAACTTTCAGCAAAGG
BSM-CRISP2-Rev	CRISPR-Cas9	AAAACCTTTGCTGAAAGTTTCCTCCA
BSM-REV2-screen		CTTTGCTGAAAGTTTCCTCC

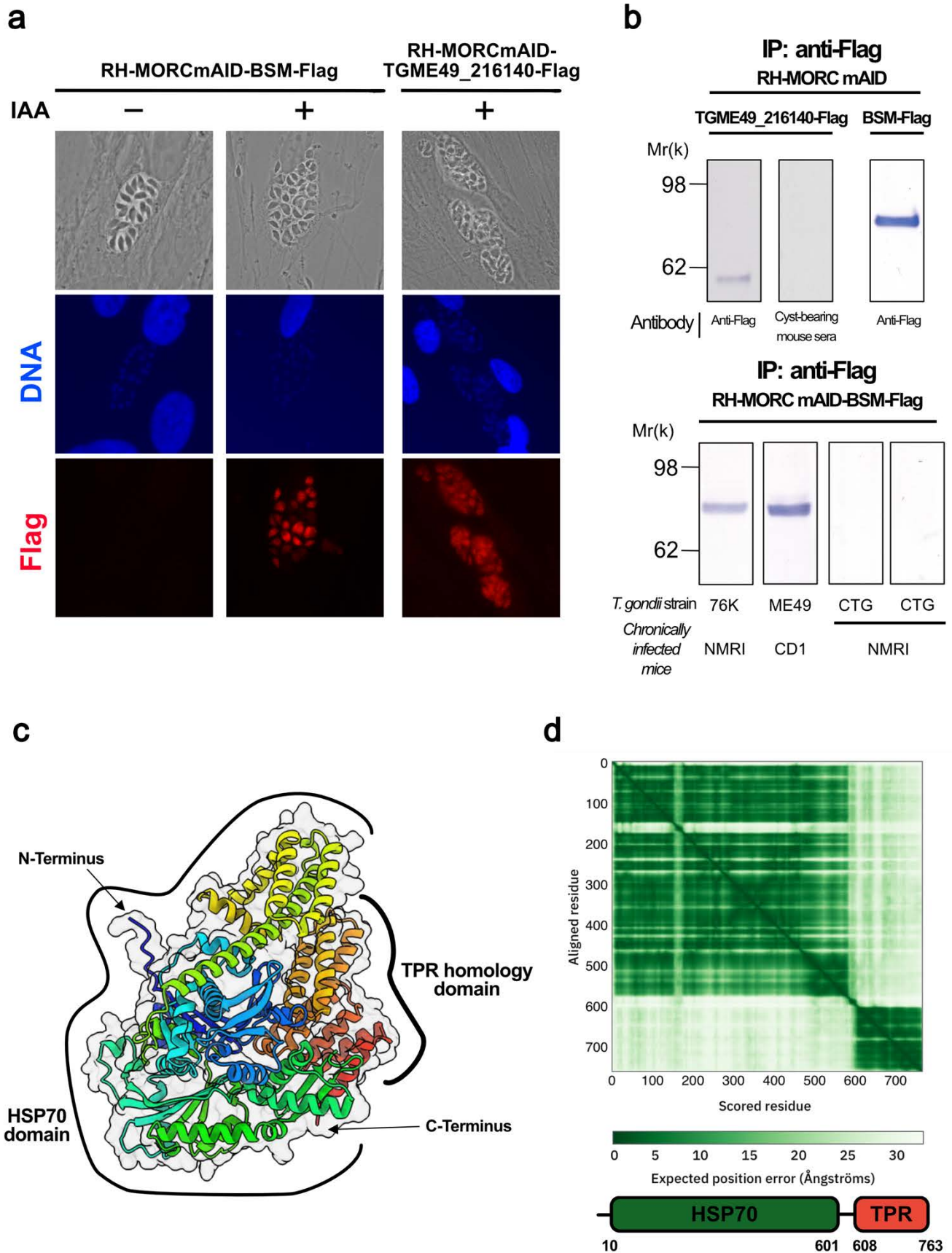


Figure 2

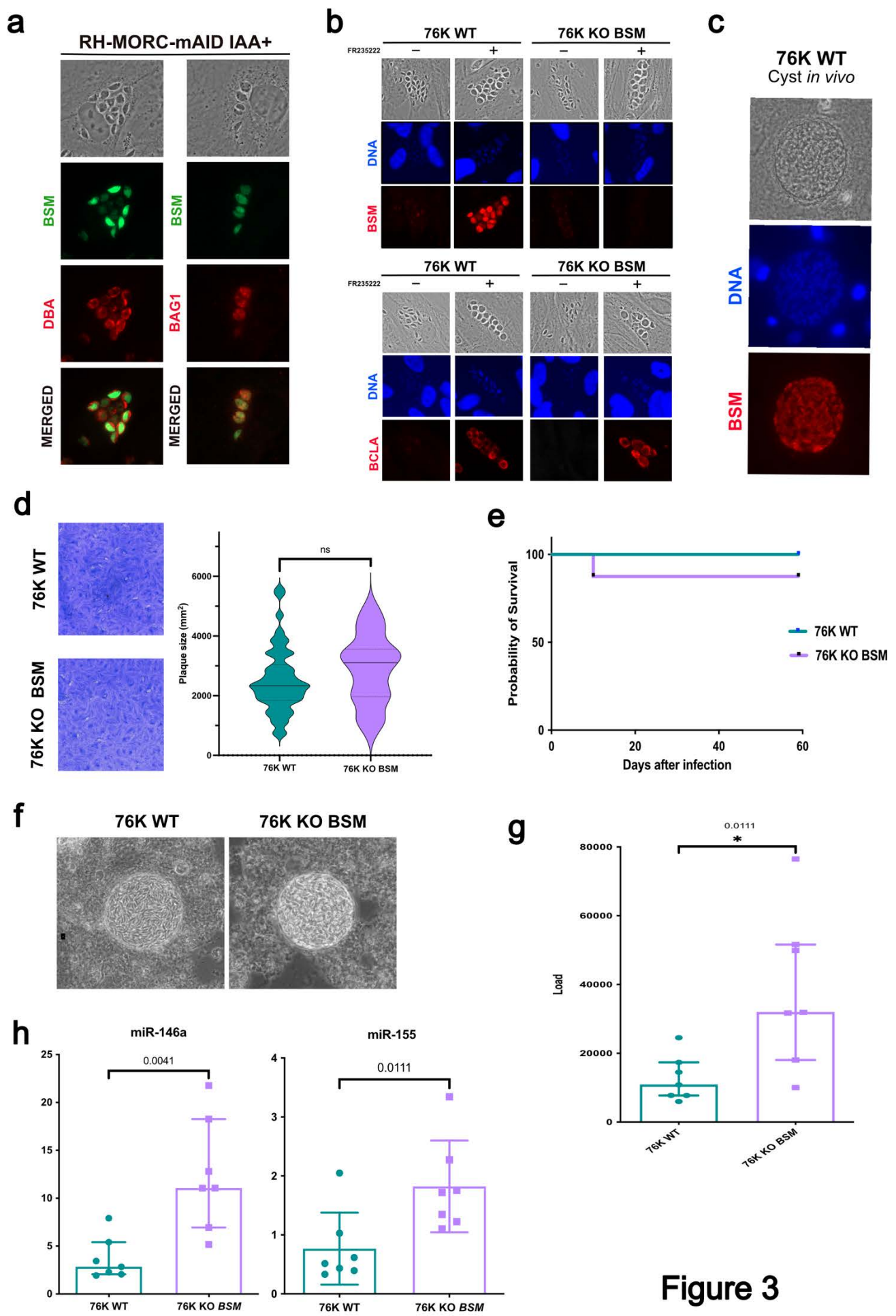


Figure 3

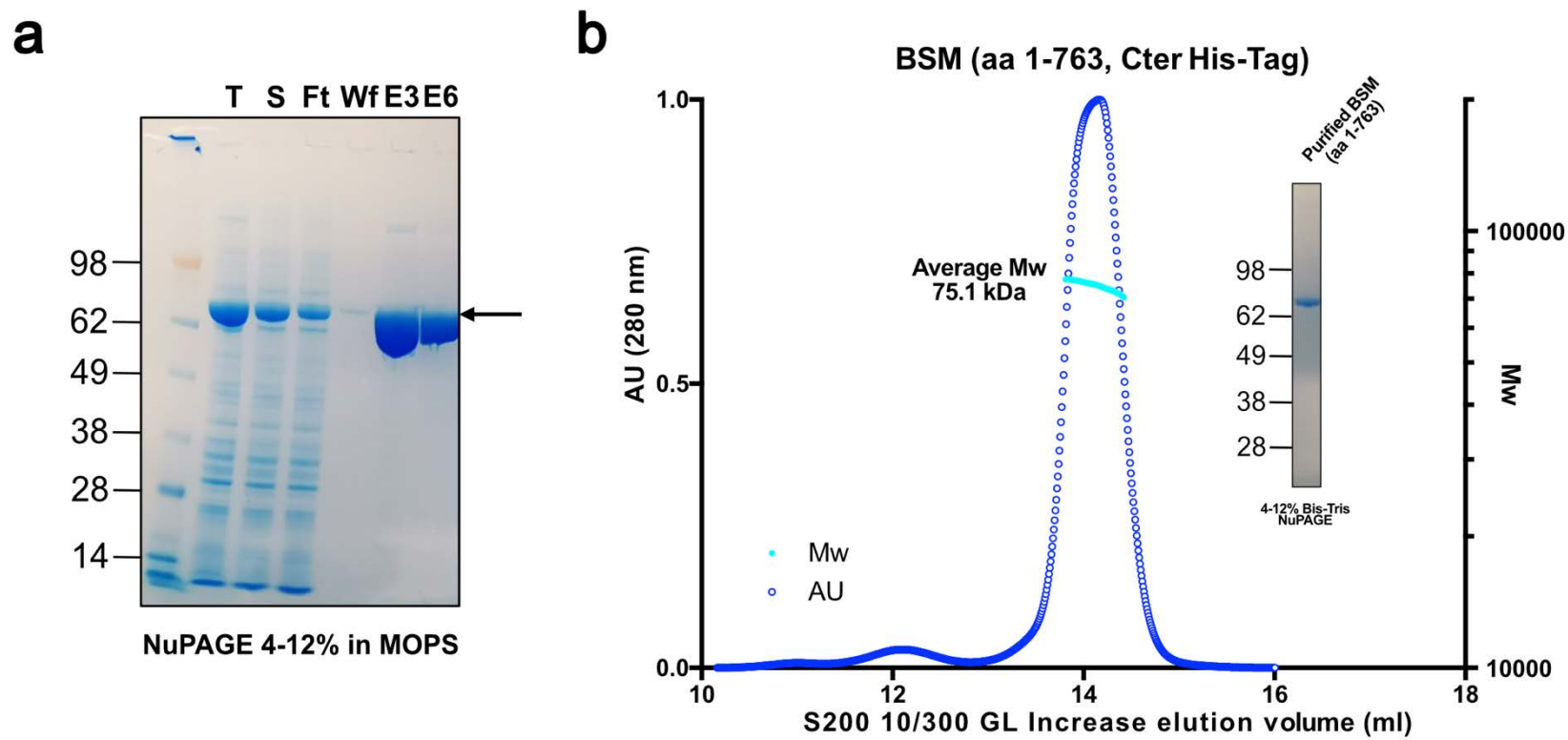


Figure 4

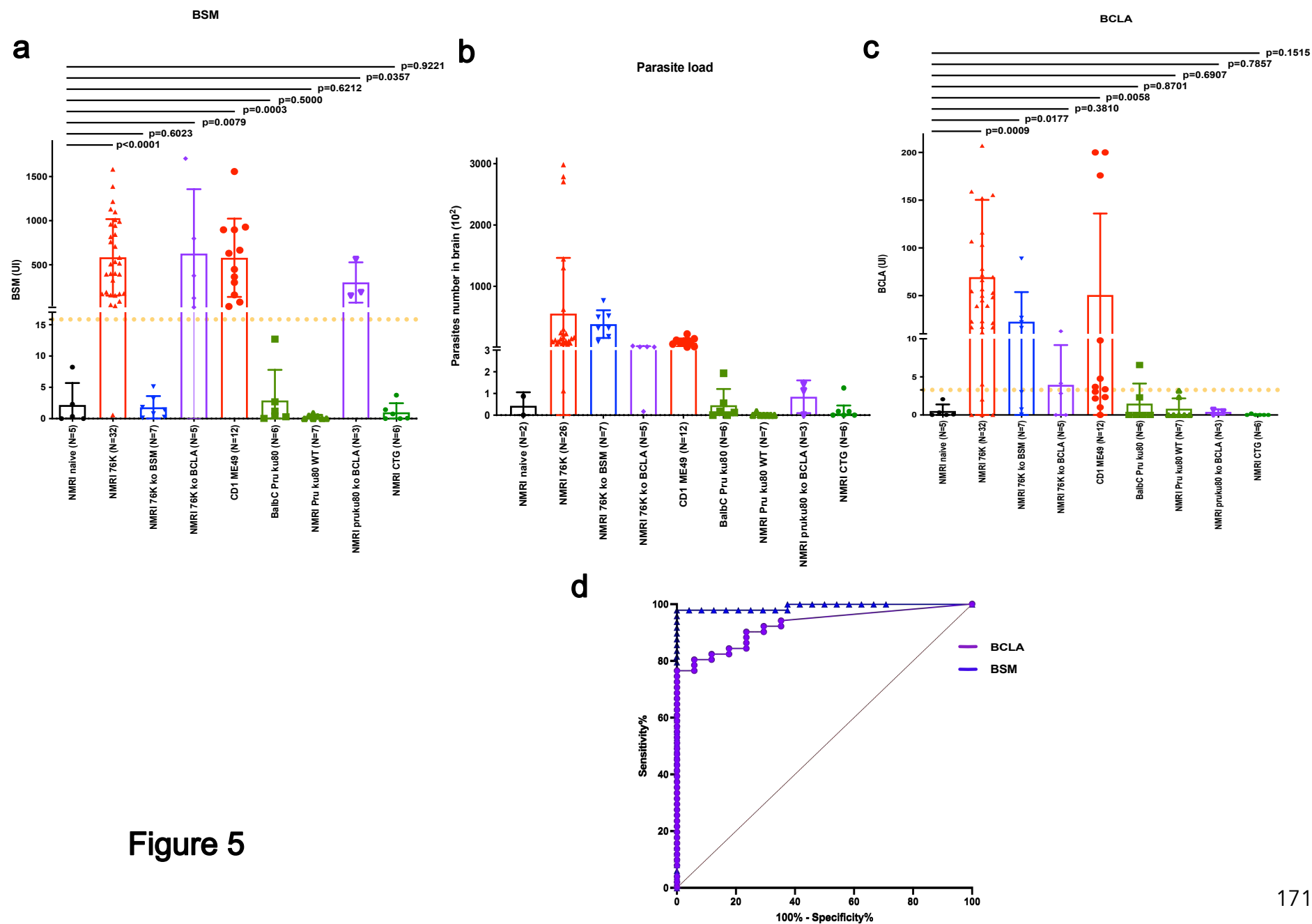
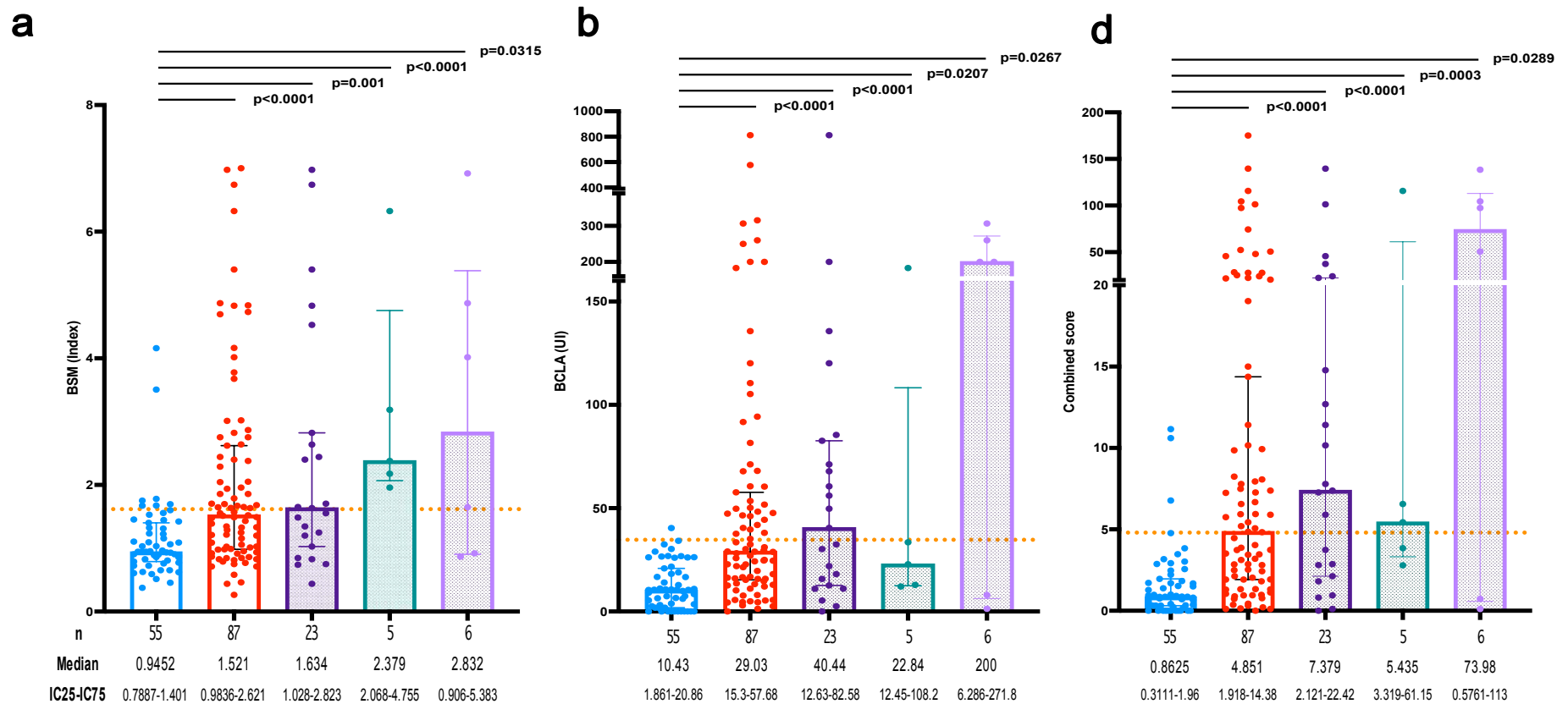


Figure 5



- Seronegative
- Past infection
- ocular toxoplasmosis
- Cerebral toxoplasmosis
- Asymptomatic reactivation

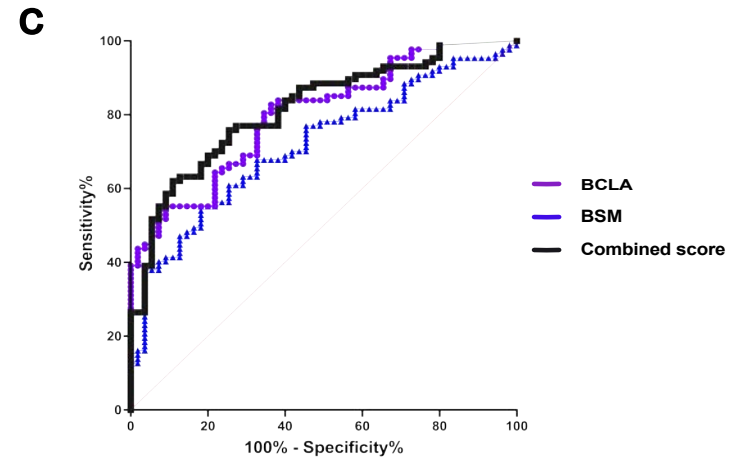


Figure 6

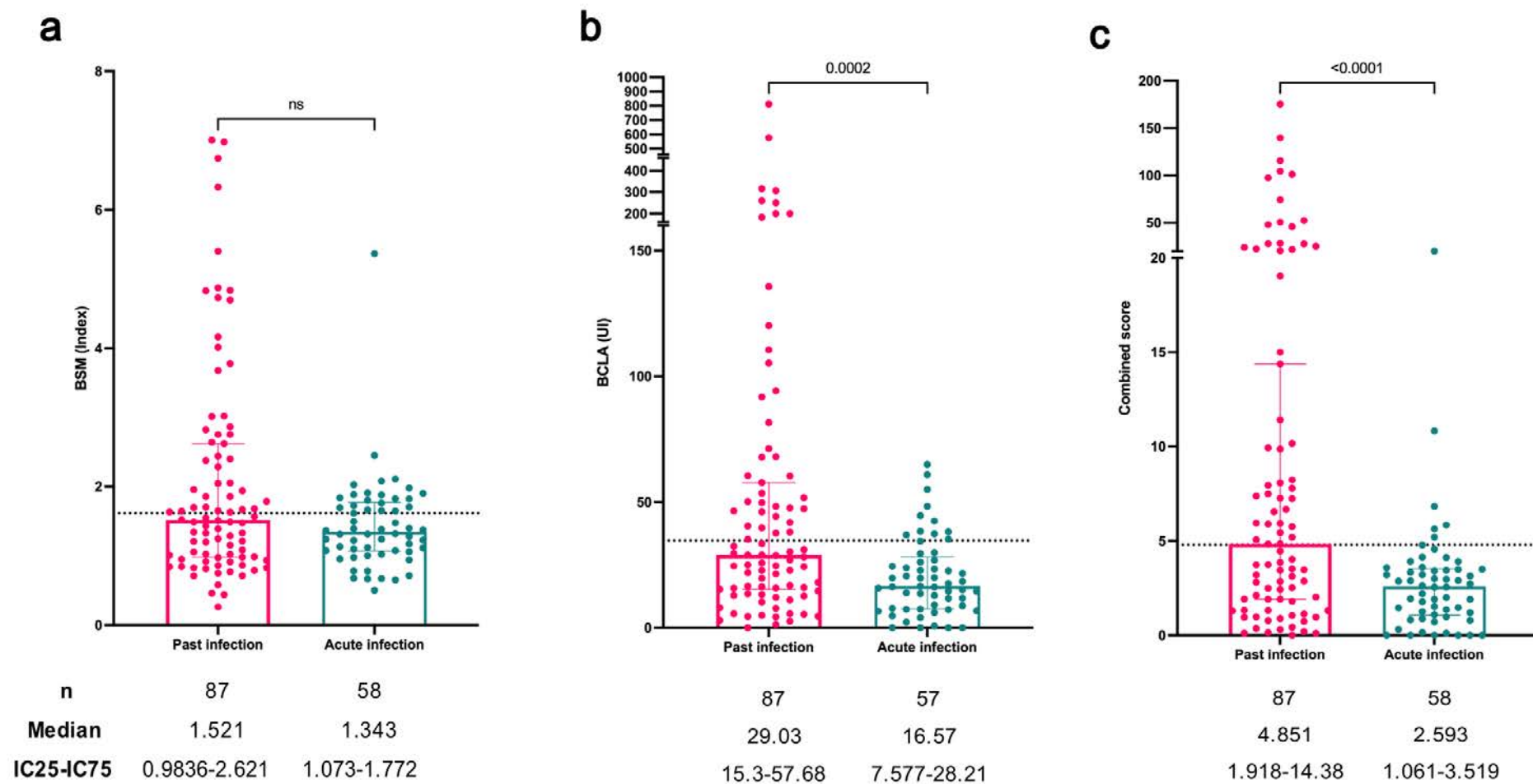


Figure 7

DISCUSSION GENERALE

Après l'identification de BCLA par notre équipe de recherche, le présent travail a permis d'identifier BSM, un nouveau marqueur sérologique du bradyzoïte, par une approche originale non ciblée.

1. DEPLETER MORC POUR REVELER DES ANTIGENES BRADYZOÏTES

L'une des raisons pour lesquelles le bradyzoïte est encore entouré de mystère – du moins plus que ne l'est le tachyzoïte –, réside dans la difficulté à obtenir ce stade parasitaire en quantité suffisante pour envisager certaines études. En effet, si le tachyzoïte se cultive aisément *in vitro*, l'obtention de kystes matures requiert l'infection chronique et le sacrifice d'animaux de laboratoire. Si différents procédés physiques (choc thermique) ou chimiques (stress alcalin, carence en nutriments...) peuvent déclencher la différenciation *in vitro* (Cerutti et al., 2020), ces méthodes d'induction sont difficiles à maîtriser et provoquent l'expression de divers protéines de réponse au stress non spécifique du bradyzoïte qui complexifie les analyses protéomiques. La mise en évidence par notre équipe de la capacité MORC à arbitrer dans une dimension épigénétique la balance entre les différents répertoires transcriptionnels spécifiques à chaque stade de *T. gondii* (Farhat et al., 2020), a permis d'envisager l'exploration de l'immunogénicité du protéome du bradyzoïte à partir d'un outil parfaitement maîtrisé. En effet, l'expression des gènes et la cinétique de celle-ci a été largement caractérisée dans le contexte de déplétion de MORC via le système *Auxin Inducible Degrone*.

D'autre part, dans la littérature concernant *T. gondii*, rares sont les études faisant appel à des procédés de purification biochimique par chromatographie conventionnelle à partir d'extraits protéiques complexes pour aboutir à l'isolement et à l'identification d'une protéine d'intérêt.

L'identification de BSM par ce procédé démontre la faisabilité de l'utilisation de MORC pour explorer les aspects du protéome de stades parasitaires autres que tachyzoïte. La déplétion de MORC conduisant également à l'expression de 85% des gènes définis comme étant strictement exprimés au stade mérozoïte et 89% de ceux exprimés par le sporozoïte *T. gondii*, l'utilisation de cet outil peut également être envisagée pour étudier ces stades non encore cultivables *in vitro* et difficiles à obtenir sans recourir à l'infection de chats.

2. BSM, DNAK-TPR DE FONCTION INCONNUE

Nos travaux ont donc mis en évidence la protéine codée par TGME49_202020 et que nous avons par la suite nommée BSM, comme une protéine immunogène et spécifique du bradyzoïte. Si quelques occurrences à cette protéine sous l'appellation DnaK-TPR peuvent être retrouvées dans la littérature, elle reste encore peu caractérisée, et son immunogénicité n'avait encore jamais été étudiée.

Une référence à TGME_202020 apparaît pour la première fois en 2008 dans une étude utilisant l'hybridation soustractive à partir de tachyzoïtes de la souche RH et de bradyzoïtes de la même souche induits *in vitro*, pour identifier de nouveaux gènes spécifiques du bradyzoïte (Friesen et al., 2008). Cette étude avait révélé 4 gènes exprimés plus de cent fois plus chez les bradyzoïtes que chez le tachyzoïte, parmi lesquels figurait TGME_202020, surexprimé par un facteur 234 (Friesen et al., 2008).

En 2011, Ueno et al. se sont intéressés à la protéine codée par ce gène du fait de son expression sélective au stade bradyzoïte, et de son domaine tétratricopeptide (TPR) (Ueno et al., 2011). Les domaines TPC correspondent à des séquences de 34 résidus d'acides aminés organisées en tandem d'hélices α qui sont impliqués dans les interactions protéine-protéine. Ils sont retrouvés dans de nombreuses protéines participant à différents processus et fonctions cellulaires, tels que la régulation de l'expression des gènes, ou du cycle cellulaire (D'Andrea & Regan, 2003). Aussi, les auteurs ont-ils supposé que la protéine DnaK-TPR devait avoir une fonction importante au sein du bradyzoïte. Ils sont d'abord parvenus à produire le fragment C-terminal de la protéine – mais pas la protéine entière – en *E. coli* et ont utilisé la protéine recombinante ainsi produite pour développer des anticorps chez la souris et le lapin. Ces anticorps ont été utilisés pour étudier par immunofluorescence la localisation de DnaK-TPR dans le kyste, et le marquage observé était superposable à celui de BAG1. Au cours de notre étude, nous avons pu confirmer la localisation intracytoplasmique au sein des bradyzoïtes, et ce en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine entière produite en système d'expression baculovirus. D'autre part, via un screening par système double hybride en levure, Ueno et al. ont également identifié l'interaction de DnaK-TPR avec la protéine chaperonne p23 (Ueno et al., 2011).

Plus récemment, Yang et al. ont développé une lignée parasitaire inactivée dans le gène *DnaK-TPR* et ont ainsi montré l'absence d'impact de cette délétion sur la croissance des tachyzoïtes *in vitro* (Yang et al., 2017). Nous avons obtenu des résultats similaires dans notre étude. Si l'absence d'un quelconque rôle de cette protéine dans la prolifération du tachyzoïte aurait pu être anticipée du fait de l'absence de détection de son expression à ce stade, il convenait de vérifier l'observation de Yang et al.,

notamment parce que ces derniers ont également constaté une atténuation de la virulence de la lignée mutante par rapport à la lignée sauvage. Nous n'observons quant à nous aucune différence en termes de virulence, mais de nombreuses divergences de méthodologie entre notre étude et celle de Yang et al. peuvent expliquer ces résultats contradictoires (fond génétique des souris, inoculum parasitaire...). Nous avons également utilisé moins d'animaux (8 vs 40 par souche), ce qui peut potentiellement affaiblir nos statistiques sur ce point, mais l'impact d'une protéine non exprimée au stade tachyzoïte sur la virulence aiguë de l'infection n'en demeure pas moins surprenant.

3. BSM, ANTIGENE INTRACYTOPLASMIQUE IMMUNOGENE

Les protéines les plus immunogènes du tachyzoïte sont essentiellement localisées à la surface de celui-ci (SAG1, SAG2A, SRS3), ou au niveau de la membrane parasitophore (protéines de rhoptries, GRA6, GRA7, GRA8) (Clough & Frickel, 2017).

C'est également le cas de BCLA, exprimée par les bradyzoïtes et localisée à la paroi du kyste. La localisation intracytoplasmique de BSM interroge donc quant aux modalités qui encadrent la présentation de cet antigène au système immunitaire. S'agit-il d'un processus qui fait suite à la destruction de kystes par les défenses immunitaires dans des tissus reconnus comme immunoprivilégiés ? Les antigènes présentés sont-ils issus de bradyzoïtes libérés suite à la rupture spontanée de kystes ?

Des modalités de présentation différentes entre BCLA et BSM pourraient potentiellement expliquer les variations de la réponse humorale observées pour ces deux antigènes, mais peut-être également les différences entre le modèle murin et l'humain.

4. INTERET D'UN MARQUEUR DE PORTAGE DE KYSTE CHEZ L'ANIMAL

Nos travaux démontrent l'immunogénicité de BSM chez la souris, et la capacité de ce test à identifier les souris porteuses de kystes avec une sensibilité et une spécificité de 97,96 % (IC95 : 89,31 - 99,90) et de 100,0 % respectivement. Cela avait été démontré précédemment pour BCLA également (Dard et al., 2021). La sérologie bradyzoïte est ainsi corrélée à la charge parasitaire intracérébrale en phase chronique de l'infection murine.

Une précédente étude réalisée par notre équipe avait déjà identifié deux micro-ARN, miR-146a and miR-155, dont l'expression était exclusivement induite dans le cerveau de souris portant des kystes (Cannella et al., 2014). L'avantage considérable de disposer de marqueurs sérologiques cependant, réside dans le fait que la détection

se fait ici dans le sérum, prélèvement peu invasif, renouvelable et ne nécessitant pas le sacrifice systématique de l'animal.

Les procédés de purification de kystes à partir de cerveaux de souris sont relativement laborieux et chronophages. En plus de l'intérêt éthique de réduire le nombre d'animaux nécessaires aux études s'intéressant à la charge parasitaire en phase chronique d'infection, la sérologie bradyzoïte permettrait également d'alléger les protocoles expérimentaux en recherche fondamentale.

Au-delà de cette application concrète envisageable à court terme, cette étude ouvre également la voie à de nombreuses autres qui permettraient d'apprécier la réponse humorale anti-bradyzoïte chez les animaux d'élevage destinés à l'alimentation humaine, dans une perspective de développement d'une filière de viande « *Toxoplasma-free* ».

Rompre la chaîne de transmission est en effet un enjeu de santé publique, qui doit s'envisager dans le cadre d'une approche « *One Health* » (Aguirre et al., 2019), et cela passe par la standardisation et l'application de tests permettant d'évaluer le risque alimentaire dans les abattoirs, comme le recommande le groupe d'experts sur les risques biologiques de l'autorité européenne de sécurité alimentaire (Panel on Biological Hazards, 2007). Il convient que ces tests présentent des performances comparables pour un large panel d'animaux, et qu'ils soient un réel reflet de la charge en parasites viables, et donc du risque de transmission. En cela, les techniques directes, que ce soit par biologie moléculaire ou par inoculation à l'animal, ne peuvent être pleinement satisfaisantes en raison de la répartition aléatoire des kystes pouvant générer de faux négatifs. Les techniques indirectes seraient à privilégier car elles sont plus simples à utiliser dans ce contexte, et qu'elles peuvent également être concluantes sur le jus de viande aisément obtenu en abattoir (Wingstrand et al., 1997). Cependant, une stricte corrélation entre les tests sérologiques actuels et la détection de parasites viables dans les carcasses n'est pas toujours observée (Opsteegh et al., 2019). L'implémentation de la sérologie bradyzoïte en complément de la sérologie tachyzoïte constitue une piste d'amélioration pour tenter de dépasser cet obstacle.

5. DIFFICULTES D'INTERPRETATION DE LA SEROLOGIE BRADYZOÏTE CHEZ L'HUMAIN

Si les résultats de la sérologie bradyzoïte chez la souris sont sans ambiguïté, leur interprétation chez l'humain est plus complexe. Il convient de rappeler que l'immunité anti-*Toxoplasma* de l'humain n'est pas la même que celle de la souris. Les gènes qui codent pour les TLR11 et 12 ainsi que pour les IRG, éléments centraux de la réponse

immunitaire cellulaire chez la souris infectée, sont absents chez l'humain. Gazzinelli et al. émettaient récemment l'hypothèse selon laquelle la longue co-évolution de *T. gondii* avec la souris, hôte intermédiaire naturel du parasite, expliquerait la sélection de mécanismes de réponse absents chez l'humain et chez d'autres animaux domestiques qui ne sont devenus des hôtes « accidentels » que plus récemment, suite à la domestication des félins et l'adaptation de certaines espèces de rongeurs à l'expansion des grandes cités (Gazzinelli et al., 2014). Il est possible que cette pression évolutive soit également à l'origine de différences en termes de réponse immunitaire humorale.

D'autres hypothèses peuvent également être émises pour expliquer les différences observées entre les résultats de la sérologie bradyzoïte chez l'humain et chez la souris.

D'abord, l'évaluation chez la souris est réalisée sur un modèle d'infection parfaitement maîtrisé, dans lequel le moment précis de l'infection, le stade infectant, l'inoculum, le génotype parasitaire et celui de l'hôte sont connus avec précision, ce qui permet de s'affranchir de variations conséquentes de la réponse humorale observée pouvant être en lien avec ces différents points. Chez l'humain, un contact avec le parasite est simplement déduit des titres d'IgG et d'IgM, sans plus de détails dans la majorité des cas.

De plus, il est aisé d'établir avec assez de précision le portage de kystes chez les animaux de laboratoire, car le prélèvement des cerveaux à l'issue des expérimentations permet de confirmer la présence de kystes par comptage et/ou biologie moléculaire. Il n'en est pas de même chez l'humain, pour des raisons éthiques évidentes. Aussi, comment peut-on être certain que toute primo-infection par le parasite conduit systématiquement à la formation de kystes ? Et ces kystes persistent-ils réellement à vie ? Dans une récente revue de la littérature, Schlüter et Barragan questionnent ce paradigme (Schlüter & Barragan, 2019).

Si des publications objectivant la présence de kystes sur prélèvements humains existent, elles restent rares en considération de la séroprévalence de l'infection. Dans les années 60, deux équipes sont parvenues à isoler le parasite après inoculation à la souris à partir de tissus prélevés à l'autopsie de respectivement 1 sur 9 et 5 sur 52 sujets présentant une sérologie *T. gondii* positive (Remington & Cavanaugh, 1965; Walls et al., 1963). Par la suite, des kystes ont également pu être opportunément retrouvés dans le cerveau ou le ganglion lymphatique de sujets séropositifs (Argyle et al., 1983; Pusch et al., 2009). Si ces observations prouvent que le parasite peut persister chez l'humain, cela ne démontre pas leur persistance à vie chez l'ensemble des individus séropositifs.

Le risque de réactivation de l'infection en cas d'immunodépression illustre également le portage de kystes chez l'humain. On notera cependant qu'avant l'heure des antirétroviraux, il avait pu être observé qu'au sein d'une population de séropositifs pour *T. gondii* au stade SIDA et avec des CD4⁺ effondrés, seul environ 30 à 50% développaient une toxoplasmose cérébrale (Luft & Remington, 1992). Si certains allèles HLA ont pu être identifiés comme des facteurs de risque (Habegger de Sorrentino et al., 2005; Suzuki et al., 1996), l'absence de kystes chez certains sujets séropositifs pour *Toxoplasma* ne peut être exclue. Cela pourrait peut-être en partie expliquer pourquoi au sein de notre cohorte seuls 43,7% et 47,1% des patients identifiés comme présentant une immunité ancienne vis-à-vis de *T. gondii*, présentent une sérologie BSM et BCLA respectivement positive.

D'autre part, un précédent contact avec le parasite ne peut être exclu devant une sérologie négative. C'est ce que démontrent quelques publications faisant état de sérologies devenant négatives chez des sujets précédemment identifiés comme séropositifs du fait notamment d'infections congénitales (Burrells et al., 2016; Rougier et al., 2017). C'est également ce que laisse penser une récente publication qui objective 23 sérums sur 81 sérums considérés négatifs en IgG et qui s'avèrent en fait positifs en western blot (Simon et al., 2020). La question du portage de kystes peut se poser dans ces situations où le taux d'anticorps dirigés contre le tachyzoïte s'atténue avec le temps.

Enfin, si les souris de laboratoire ne sont exposées qu'à *T. gondii*, l'humain est quant à lui en contact avec d'innombrables microorganismes au cours de son existence. Une éventuelle réaction croisée entre des antigènes des tests et les anticorps non spécifiques ne peut être exclue. Des réactions croisées liées à des infections à d'autres Apicomplexes ont déjà été rapportées dans la littérature (Gondim et al., 2017). En particulier, les Apicomplexes des genres *Hammondia* et *Neospora* expriment des protéines qui présentent une similarité importante avec BSM (94,89% pour HHA_202020 de *Hammondia hammondi* et 77,46% pour NCLIV_022840 de *Neospora caninum*) (**Figure 22**). Bien que la capacité de *Hammondia hammondi* à infecter l'humain ne soit pas démontrée, il est possible qu'un contact avec un Apicomplexe proche de *T. gondii* puisse entraîner des interférences avec la sérologie bradyzoïte. Il conviendra notamment de vérifier l'existence et la nature d'éventuelles réactions croisées au cours de nos explorations futures chez l'animal.

En conclusion, les difficultés d'interprétation chez l'humain peuvent tout à fait être en lien avec un défaut de performance de la sérologie bradyzoïte chez cet hôte, mais il

se pourrait également que certains aspects de la kystogénèse chez l'humain nous échappent encore, faute de moyen pour les explorer.

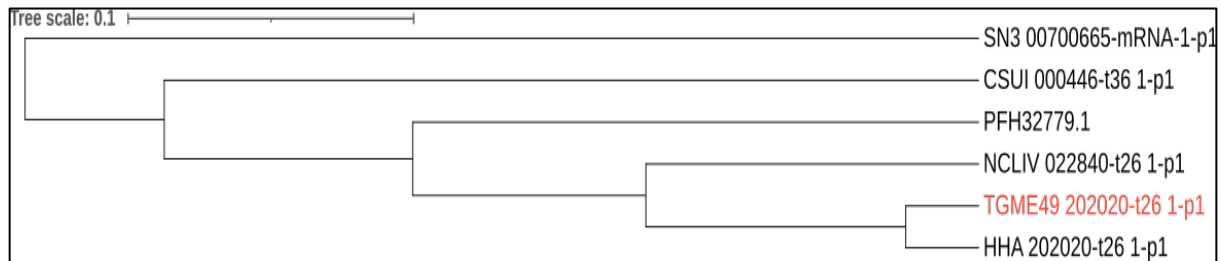


Figure 22. Arbre phylogénétique des homologues de TGME49_202020 parmi les Apicomplexes.

La séquence de la protéine codée par TGME49_202020 présente 37,66%, 47,97%, 60,76%, 77,46% et 94,89% de similarité avec celles des protéines codées respectivement par SN3_00700665 de *Sarcocystis neurona*, CSUI_000446 de *Cystoisospora suis*, PFH32779 de *Besnoitia besnoiti*, NCLIV_022840 de *Neospora caninum*, et HHA_202020 de *Hammondia hammondi* (Sources : ToxoDB).

6. PERSPECTIVES

Puisque le bradyzoïte est au cœur de la persistance de *T. gondii* et que paradoxalement, la sérologie actuelle ignore les antigènes de ce stade parasitaire, se pourrait-il que les tests existants ne reflètent que partiellement la situation vis-à-vis de l'infection ? Et est-ce que la sérologie bradyzoïte pourrait enrichir le diagnostic ou la vision globale de l'évolution de l'infection ?

Ces questions qui restent en suspens ouvrent la voie à de nombreux travaux à venir sur le sujet.

1. AXES D'AMELIORATION

Il était essentiel d'évaluer initialement chacun des marqueurs sérologiques du bradyzoïte de façon indépendante, afin d'avoir une vision globale des performances de chacun en fonction du contexte (hôte, contexte clinique et immunitaire...). Nos résultats montrent cependant que l'utilisation d'un score combiné intégrant les résultats des 2 marqueurs serait sensiblement plus performante. Aussi sera-t-il envisagé très prochainement de développer un test ELISA combinant directement les 2 marqueurs, dans des proportions qui restent à définir. Une utilisation de ces antigènes dans d'autres méthodes va également être évaluée. Ces deux marqueurs pourraient en effet être implémentés dans un immunoblot combinant éventuellement ces antigènes bradyzoïtes à des antigènes tachyzoïtes classiquement utilisés (notamment SAG1).

En vue d'une utilisation vétérinaire ou en sécurité alimentaire, une évaluation de la recherche d'anticorps dirigés contre ces antigènes dans d'autres matrices plus facilement accessibles (jus de viande, fluide oraux) pourrait également présenter un intérêt en santé publique.

Aussi, et puisque l'immunité anti-*Toxoplasma* est principalement médiée par une réponse lymphocytaire T, et par la production d'IFN- γ , le développement de tests basés sur des antigènes bradyzoïtes mais explorant la voie de l'immunité cellulaire, pourrait être envisagé (Chapey et al., 2010).

2. CONSEQUENCES SUSPECTEES DE L'INFECTION CHRONIQUE : UN NOUVEL ANGLE D'EVALUATION

Comme évoqué dans la première partie de ce manuscrit, l'infection chronique par *T. gondii* a été associée à diverses modifications comportementales ou pathologies chez l'humain, au travers d'études épidémiologiques de qualité variable. Puisque c'est ici l'infection chronique qui est mise en cause, une réévaluation des associations précédemment évoquées à la lumière de la sérologie bradyzoïte, *a priori* plus adaptée au contexte de latence, pourrait être envisagée.

Aussi, un travail a été entrepris en ce sens concernant les désordres mentaux, en collaboration avec la fondation FondaMental (<https://www.fondation-fondamental.org/>). Plus de 700 sérums d'une cohorte de patients présentant des troubles mentaux bien caractérisés ont été évalués en sérologie bradyzoïte. Nous sommes actuellement dans l'attente de l'analyse des résultats.

Une étude pourra également être envisagée concernant les pathologies tumorales intracérébrales (Abdollahi et al., 2022).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelbaset, A. E., Fox, B. A., Karram, M. H., Ellah, M. R. A., Bzik, D. J., & Igarashi, M. (2017). Lactate dehydrogenase in *Toxoplasma gondii* controls virulence, bradyzoite differentiation, and chronic infection. *PLOS ONE*, 12(3), e0173745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173745>
- Abdollahi, A., Razavian, I., Razavian, E., Ghodsian, S., Almkhtar, M., Marhoommirzabak, E., Sartip, B., Parsa, H., & Rostami, A. (2022). *Toxoplasma gondii* infection/exposure and the risk of brain tumors: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology*, 77, 102119. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2022.102119>
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., ... Zhang, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., ... Taylor, M. F. J. R. (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399-451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Adl, S. M., Simpson, Alastair. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., leGall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., ... Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 59(5), 429-493. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Aguirre, A. A., Longcore, T., Barbieri, M., Dabritz, H., Hill, D., Klein, P. N., Lepczyk, C., Lilly, E. L., McLeod, R., Milcarsky, J., Murphy, C. E., Su, C., VanWormer, E., Yolken, R., & Sizemore, G. C. (2019). The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth*, 16(2), 378-390. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>
- Aikawa, M., Miller, L., Johnson, J., & Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *Journal of Cell Biology*, 77(1), 72-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.77.1.72>
- Ajzenberg, D., Bañuls, A. L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., & Dardé, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 34(10), 1185-1196. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.007>
- Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., & Dardé, M.-L. (2010). Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4641-4645. <https://doi.org/10.1128/JCM.01152-10>
- Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., & Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory

Organelles. *PLOS Pathogens*, 1(2), e17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>

Allahyari, M., Mohabati, R., Babaie, J., Amiri, S., Siavashani, Z. J., Zare, M., Sadeghiani, G., & Golkar, M. (2015). Production of in-vitro refolded and highly antigenic SAG1 for development of a sensitive and specific *Toxoplasma* IgG ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 416, 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.11.012>

Almeria, S., Cinar, H. N., & Dubey, J. P. (2019). *Cyclospora cayetanensis* and cyclosporiasis: An update. *Microorganisms*, 7(9), 317.

Álvarez García, G., Davidson, R., Jokelainen, P., Klevar, S., Spano, F., & Seeber, F. (2021). Identification of Oocyst-Driven *Toxoplasma gondii* Infections in Humans and Animals through Stage-Specific Serology—Current Status and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(11), Art. 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112346>

Andrade, R. M., Wessendarp, M., Gubbels, M.-J., Striepen, B., & Subauste, C. S. (2006). CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(9), 2366-2377. <https://doi.org/10.1172/JCI28796>

Andrade, W. A., Souza, M. do C., Ramos-Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, M. S., Melo, M. B., Bartholomeu, D. C., Ghosh, S., Golenbock, D. T., & Gazzinelli, R. T. (2013). Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice. *Cell Host & Microbe*, 13(1), 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003>

Argyle, J. C., Schumann, G. B., Kjeldsberg, C. R., & Athens, J. W. (1983). Identification of a *Toxoplasma* Cyst by Fine-needle Aspiration. *American Journal of Clinical Pathology*, 80(2), 256-258. <https://doi.org/10.1093/ajcp/80.2.256>

Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & Vectors*, 13(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>

Aubert, D., Maine, G. T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., Brojanac, S., Chovan, L. E., Nowlan, S. F., & Pinon, J. M. (2000). Recombinant Antigens To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1144-1150.

Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M., & Aravind, L. (2005). Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Research*, 33(13), 3994-4006. <https://doi.org/10.1093/nar/gki709>

Balasundaram, M. B., Andavar, R., Palaniswamy, M., & Venkatapathy, N. (2010). Outbreak of Acquired Ocular Toxoplasmosis Involving 248 Patients. *Archives of Ophthalmology*, 128(1), 28-32. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.354>

Barragan, A., Brossier, F., & Sibley, L. D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii*

involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cellular Microbiology*, 7(4), 561-568. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x>

Batz, M., Hoffmann, S., & Morris, J. (2014). Disease-Outcome Trees, EQ-5D Scores, and Estimated Annual Losses of Quality-Adjusted Life Years (QALYs) for 14 Foodborne Pathogens in the United States. *Foodborne pathogens and disease*, 11. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1658>

Beghetto, E., Buffolano, W., Spadoni, A., Pezzo, M. D., Cristina, M. D., Minenkova, O., Petersen, E., Felici, F., & Gargano, N. (2003). Use of an Immunoglobulin G Avidity Assay Based on Recombinant Antigens for Diagnosis of Primary *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5414-5418. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5414-5418.2003>

Behnke, M. S., Fentress, S. J., Mashayekhi, M., Li, L. X., Taylor, G. A., & Sibley, L. D. (2012). The Polymorphic Pseudokinase ROP5 Controls Virulence in *Toxoplasma gondii* by Regulating the Active Kinase ROP18. *PLOS Pathogens*, 8(11), e1002992. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002992>

Béla, S. R., Oliveira Silva, D. A., Cunha-Júnior, J. P., Pirovani, C. P., Chaves-Borges, F. A., Reis de Carvalho, F., Carrijo de Oliveira, T., & Mineo, J. R. (2008). Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: Analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(3), 245-254. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.017>

Ben Chaabene, R., Lentini, G., & Soldati-Favre, D. (2020). Biogenesis and discharge of the rhoptries: Key organelles for entry and hijack of host cells by the Apicomplexa. *Molecular Microbiology*, mmi.14674. <https://doi.org/10.1111/mmi.14674>

Ben-Harari, R. R., Goodwin, E., & Casoy, J. (2017). Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review. *Drugs in R&D*, 17(4), 523-544. <https://doi.org/10.1007/s40268-017-0206-8>

Bennett, R., & Ijpelaar, J. (2005). Updated Estimates of the Costs Associated with Thirty Four Endemic Livestock Diseases in Great Britain: A Note. *Journal of Agricultural Economics*, 56(1), 135-144. <https://doi.org/10.1111/j.1477-9552.2005.tb00126.x>

Berdoy, M., Webster, J. P., & Macdonald, D. W. (2000). Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1452), 1591-1594. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1182>

Berná, L., Marquez, P., Cabrera, A., Greif, G., Francia, M. E., & Robello, C. (2021). Reevaluation of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. *Genome Research*, 31(5), 823-833. <https://doi.org/10.1101/gr.262832.120>

Berney, C., Ciuprina, A., Bender, S., Brodie, J., Edgcomb, V., Kim, E., Rajan, J., Parfrey, L. W., Adl, S., Audic, S., Bass, D., Caron, D. A., Cochrane, G., Czech, L., Dunthorn, M., Geisen, S., Glöckner, F. O., Mahé, F., Quast, C., ... de Vargas, C. (2017). UniEuk: Time to Speak a Common Language

in Protistology! *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(3), 407-411.
<https://doi.org/10.1111/jeu.12414>

Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., Mercier, A., Devillard, S., & Ajzenberg, D. (2017). Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 48, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.020>

Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.-F., & Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion. *PLOS Pathogens*, 5(2), e1000309. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000309>

Bigna, J. J., Tochie, J. N., Tounouga, D. N., Bekolo, A. O., Ymele, N. S., Youda, E. L., Sime, P. S., & Nansseu, J. R. (2020). Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: A systematic review, modelling and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10, 12102. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69078-9>

Binquet, C., Lejeune, C., Seror, V., Peyron, F., Bertaux, A.-C., Scemama, O., Quantin, C., Béjean, S., Stillwaggon, E., & Wallon, M. (2019). The cost-effectiveness of neonatal versus prenatal screening for congenital toxoplasmosis. *PLOS ONE*, 14(9), e0221709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221709>

Bishop, R. P., Odongo, D., Ahmed, J., Mwamuye, M., Fry, L. M., Knowles, D. P., Nanteza, A., Lubega, G., Gwakisa, P., Clausen, P.-H., & Obara, I. (2020). A review of recent research on *Theileria parva*: Implications for the infection and treatment vaccination method for control of East Coast fever. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(S1), 56-67. <https://doi.org/10.1111/tbed.13325>

Biswas, A., Bruder, D., Wolf, S. A., Jeron, A., Mack, M., Heimesaat, M. M., & Dunay, I. R. (2015). *Ly6Chigh Monocytes Control Cerebral Toxoplasmosis*. 14.

Blanchard, N., Salvioni, A., & Robey, E. A. (2020). Adaptive immunity. In *Toxoplasma gondii* (p. 1107-1146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00026-8>

Blaszkowska, J., & Góralska, K. (2014). Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development. *Annals of parasitology*, 60(4).

Bobic, B., Šibalić, D., & Djurkovic-Djakovic, O. (1991). High Levels of IgM Antibodies Specific for *Toxoplasma gondii* in Pregnancy 12 Years after Primary Toxoplasma Infection. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 31(3), 182-184. <https://doi.org/10.1159/000293151>

Boillat, M., Hammoudi, P.-M., Dogga, S. K., Pagès, S., Goubran, M., Rodriguez, I., & Soldati-Favre, D. (2020). Neuroinflammation-Associated Aspecific Manipulation of Mouse Predator Fear by *Toxoplasma gondii*. *Cell Reports*, 30(2), 320-334.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.019>

Boireau, P., Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization (Éds.). (2014). *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites: Report of a joint FAO/WHO Expert Meeting, 3-7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy*. Food and Agriculture Organization of the United Nations ; World Health Organization.

Boothroyd, J. C., Black, M., Bonnefoy, S., Hehl, A., Knoll, L. J., Manger, I. D., Ortega-Barria, E., &

- Tomavo, S. (1997). Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 352(1359), 1347-1354. <https://doi.org/10.1098/rstb.1997.0119>
- Boothroyd, J. C., & Dubremetz, J.-F. (2008). Kiss and spit : The dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 79-88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>
- Borrelli, S. S., Reilly, S. M., Sharp, K. G., Cabo, L. F., Alrubaye, H. S., Di Genova, B. M., & Boyle, J. P. (2022). A transcriptional network required for *Toxoplasma gondii* tissue cyst formation is dispensable for long-term persistence [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.06.487408>
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314-331.
- Bougdour, A., Durandau, E., Brenier-Pinchart, M.-P., Ortet, P., Barakat, M., Kieffer, S., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R.-L., Bastien, O., Coute, Y., Pelloux, H., & Hakimi, M.-A. (2013). Host Cell Subversion by *Toxoplasma* GRA16, an Exported Dense Granule Protein that Targets the Host Cell Nucleus and Alters Gene Expression. *Cell Host & Microbe*, 13(4), 489-500. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002>
- Bougdour, A., Maubon, D., Baldacci, P., Ortet, P., Bastien, O., Bouillon, A., Barale, J.-C., Pelloux, H., Ménard, R., & Hakimi, M.-A. (2009). Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(4), 953-966. <https://doi.org/10.1084/jem.20082826>
- Bouwknegt, M., Devleeschauwer, B., Graham, H., Robertson, L. J., Giessen, J. W. van der, & Participants, the E.-F. workshop. (2018). Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Eurosurveillance*, 23(9), 17. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161>
- Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Hammoudi, P.-M., Cannella, D., Kieffer-Jaquinod, S., Voltaire, J., Josserand, V., Touquet, B., Couté, Y., Tardieux, I., Bougdour, A., & Hakimi, M.-A. (2019). The *Toxoplasma* effector TEEGR promotes parasite persistence by modulating NF- κ B signalling via EZH2. *Nature Microbiology*, 4(7), 1208-1220. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0431-8>
- Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Yogavel, M., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R.-L., Hussain, T., Kieffer-Jaquinod, S., Coute, Y., Pelloux, H., Tardieux, I., Sharma, A., Belrhali, H., Bougdour, A., & Hakimi, M.-A. (2013). A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 2071-2086. <https://doi.org/10.1084/jem.20130103>
- Brion, J.-P., Pelloux, H., Le Marc'hadour, F., Stahl, J.-P., Vilde, J.-L., & Micoud, M. (1992). Acute Toxoplasmic Hepatitis in a Patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 15(1), 183-184. <https://doi.org/10.1093/clinids/15.1.183>
- Brown, K. M., Long, S., & Sibley, L. D. (2018). Conditional Knockdown of Proteins Using Auxin-inducible Degron (AID) Fusions in *Toxoplasma gondii*. *Bio-protocol*, 8(4).

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2728>

Buffolano, W., Beghetto, E., Del Pezzo, M., Spadoni, A., Di Cristina, M., Petersen, E., & Gargano, N. (2005). Use of Recombinant Antigens for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5916-5924. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5916-5924.2005>

Burnett, A. J., Shortt, S. G., Isaac-Renton, J., King, A., Werker, D., & Bowie, W. R. (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology*, 105(6), 1032-1037. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(98\)96004-3](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(98)96004-3)

Burrells, A., Opsteegh, M., Pollock, K. G., Alexander, C. L., Chatterton, J., Evans, R., Walker, R., McKenzie, C.-A., Hill, D., Innes, E. A., & Katzer, F. (2016). The prevalence and genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* from individuals in Scotland, 2006–2012. *Parasites & Vectors*, 9(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1610-6>

Cabral, C. M., Tuladhar, S., Dietrich, H. K., Nguyen, E., MacDonald, W. R., Trivedi, T., Devineni, A., & Koshy, A. A. (2016). Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathogens*, 12(2), e1005447. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005447>

Calero-Bernal, R., & Gennari, S. M. (2019). Clinical Toxoplasmosis in Dogs and Cats : An Update. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2019.00054>

Cannella, D., Brenier-Pinchart, M.-P., Braun, L., van Rooyen, J. M., Bougdour, A., Bastien, O., Behnke, M. S., Curt, R.-L., Curt, A., Saeij, J. P. J., Sibley, L. D., Pelloux, H., & Hakimi, M.-A. (2014). MiR-146a and miR-155 delineate a microRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell reports*, 6(5), 928-937. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.002>

Carne, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A. M., Peneau, C., Neron, P., & Dardé, M. L. (2002). Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4037-4044. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002>

Cekanaviciute, E., Dietrich, H. K., Axtell, R. C., Williams, A. M., Egusquiza, R., Wai, K. M., Koshy, A. A., & Buckwalter, M. S. (2014). Astrocytic TGF- β Signaling Limits Inflammation and Reduces Neuronal Damage during Central Nervous System *Toxoplasma* Infection. *The Journal of Immunology*, 192, 12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303284>

Centre national de référence & de la Toxoplasmose. (2021). *Rapport annuel d'activité—Année d'exercice 2020*.

Cerutti, A., Blanchard, N., & Besteiro, S. (2020). The Bradyzoite : A Key Developmental Stage for the Persistence and Pathogenesis of Toxoplasmosis. *Pathogens*, 9(3), 234. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030234>

Chahed Bel-Ochi, N., Bouratbine, A., & Mousli, M. (2013). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant SAG1 Antigen To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G Antibodies in Human Sera and Saliva. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(4), 468-473.

<https://doi.org/10.1128/CVI.00512-12>

Chao, C. C., Gekker, G., Hu, S., & Peterson, P. K. (1994). Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *The Journal of Immunology*, 152(3), 1246-1252.

Chapey, E., Wallon, M., Debize, G., Rabilloud, M., & Peyron, F. (2010). Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Using a Whole-Blood Gamma Interferon Release Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 41-45. <https://doi.org/10.1128/JCM.01903-09>

Chen, X.-G., Gong, Y., Hua-Li, Lun, Z.-R., & Fung, M.-C. (2001). High-Level Expression and Purification of Immunogenic Recombinant SAG1 (P30) of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 23(1), 33-37. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1483>

Chiappe Gonzalez, A. J., Vargas Matos, I., & Massucco Revoredo, V. (2020). Acute toxoplasmosis complicated with myopericarditis and possible encephalitis in an immunocompetent patient. *IDCases*, 20, e00772. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00772>

Clough, B., & Frickel, E.-M. (2017). The *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole : An Evolving Host-Parasite Frontier. *Trends in Parasitology*, 33(6), 473-488. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.007>

Cóceres, V. M., Becher, M. L., De Napoli, M. G., Corvi, M. M., Clemente, M., & Angel, S. O. (2010). Evaluation of the antigenic value of recombinant *Toxoplasma gondii* HSP20 to detect specific immunoglobulin G antibodies in *Toxoplasma* infected humans. *Experimental Parasitology*, 126(2), 263-266. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.013>

Codaccioni, C., Picone, O., Lambert, V., Maurice, P., Pomar, L., Winer, N., Guibaud, L., Lavergne, R.-A., Saliou, A.-H., Quinio, D., Benachi, A., Noel, C., Ville, Y., Cuillier, F., Pomares, C., Ferret, N., Filisetti, D., Weingertner, A.-S., Vequeau-Goua, V., ... Mandelbrot, L. (2020). Ultrasound features of fetal toxoplasmosis: A contemporary multicenter survey in 88 fetuses. *Prenatal Diagnosis*, 40(13), 1741-1752. <https://doi.org/10.1002/pd.5756>

Commodaro, A. G., Belfort, R. N., Rizzo, L. V., Muccioli, C., Silveira, C., Burnier Jr, M. N., & Belfort Jr, R. (2009). Ocular toxoplasmosis : An update and review of the literature. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 345-350. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200030>

Cook, T. B., Brenner, L. A., Cloninger, C. R., Langenberg, P., Igbide, A., Giegling, I., Hartmann, A. M., Konte, B., Friedl, M., Brundin, L., Groer, M. W., Can, A., Rujescu, D., & Postolache, T. T. (2015). "Latent" infection with *Toxoplasma gondii*: Association with trait aggression and impulsivity in healthy adults. *Journal of Psychiatric Research*, 60, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.09.019>

Cortes, H., Leitão, A., Gottstein, B., & Hemphill, A. (2014). A review on bovine besnoitiosis : A disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges,). *Parasitology*, 141(11), 1406-1417. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000262>

Courret, N., Darce, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gâtel, D., & Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*, 107(1), 309-316. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0666>

Crawford, J., Lamb, E., Wasmuth, J., Grujic, O., Grigg, M. E., & Boulanger, M. J. (2010). Structural

and Functional Characterization of SporoSAG : A SAG2-related surface antigen from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), 12063-12070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054866>

Cuomo, G., D'Abrosca, V., Rizzo, V., Nardiello, S., La Montagna, G., Gaeta, G. B., & Valentini, G. (2013). Severe polymyositis due to *Toxoplasma gondii* in an adult immunocompetent patient : A case report and review of the literature. *Infection*, 41(4), 859-862. <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0427-x>

D'Andrea, L. D., & Regan, L. (2003). TPR proteins: The versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(12), 655-662. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.10.007>

Dannemann, B. R., Vaughan, W. C., Thulliez, P., & Remington, J. S. (1990). Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 1928-1933.

Dard, C. (2018). *Identification et caractérisation de BCLA, un antigène spécifique du stade kystique de <!--Toxoplasma gondii--> et marqueur sérologique potentiel des toxoplasmoses latentes*. Université Grenoble Alpes.

Dard, C., Bailly, S., Pépin, J.-L., Brenier-Pinchart, M.-P., Fricker-Hidalgo, H., Peeters, M., Pelloux, H., & Tamisier, R. (2020). Chronic toxoplasmosis and sleepiness in obstructive sleep apnea : Is there a link? *PLOS ONE*, 15(7), e0235463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235463>

Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P., & Pelloux, H. (2016). Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends in Parasitology*, 32(6), 492-506. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>

Dard, C., Marty, P., Brenier-Pinchart, M.-P., Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., & Pomares, C. (2018). Management of toxoplasmosis in transplant recipients : An update. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(6), 447-460. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1483721>

Dard, C., Swale, C., Brenier-Pinchart, M.-P., Farhat, D. C., Bellini, V., Robert, M. G., Cannella, D., Pelloux, H., Tardieux, I., & Hakimi, M.-A. (2021). A brain cyst load-associated antigen is a *Toxoplasma gondii* biomarker for serodetection of persistent parasites and chronic infection. *BMC Biology*, 19(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00959-9>

Dardé, M. L., Bouteille, B., & Pestre-Alexandre, M. (1992). Isoenzyme Analysis of 35 *Toxoplasma gondii* Isolates and the Biological and Epidemiological Implications. *The Journal of Parasitology*, 78(5), 786-794. <https://doi.org/10.2307/3283305>

Dardé, M.-L., Ajzenberg, D., & Su, C. (2014). Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (p. 61-97). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00003-9>

Dardé, M.-L., Fougère, É., & Buxeraud, J. (2018). Les médicaments de la toxoplasmose. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(581, Supplement), 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2018.09.024>

Dauguschies, A., & Najdrowski, M. (2005). Eimeriosis in Cattle : Current Understanding. *Journal of*

Veterinary Medicine, Series B, 52(10), 417-427. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00894.x>

Delair, E., Monnet, D., Grabar, S., Dupouy-Camet, J., Yera, H., & Brézin, A. P. (2008). Respective Roles of Acquired and Congenital Infections in Presumed Ocular Toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, 146(6), 851-855. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.06.027>

Delhaes, L., Ajzenberg, D., Sicot, B., Bourgeot, P., Dardé, M.-L., Dei-Cas, E., & Houfflin-Debauge, V. (2010). Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: Case report and review. *Prenatal Diagnosis*, 30(9), 902-905. <https://doi.org/10.1002/pd.2563>

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., Dardé, M.-L., & Carne, B. (2007). Fatal Outbreak of Human Toxoplasmosis along the Maroni River: Epidemiological, Clinical, and Parasitological Aspects. *Clinical Infectious Diseases*, 45(7), e88-e95. <https://doi.org/10.1086/521246>

Denton, H., Roberts, C. W., Alexander, J., Thong, kam-wah, & Coombs, G. H. (1996). Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiology Letters*, 137(1), 103-108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08090.x>

Desmonts, G., Naot, Y., & Remington, J. S. (1981). Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: Diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(5), 486-491.

Desmonts, G., & Remington, J. S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of clinical microbiology*, 11(6), 562-568.

Di Cristina, M., Marocco, D., Galizi, R., Proietti, C., Spaccapelo, R., & Crisanti, A. (2008). Temporal and Spatial Distribution of *Toxoplasma gondii* Differentiation into Bradyzoites and Tissue Cyst Formation In Vivo. *Infection and Immunity*, 76(8), 3491-3501. <https://doi.org/10.1128/IAI.00254-08>

Di Noia, J. M., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 1-22. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740>

Dos Santos Pacheco, N., Tosetti, N., Koreny, L., Waller, R. F., & Soldati-Favre, D. (2020). Evolution, Composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa. *Trends in Parasitology*, 36(8), 688-704. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.05.001>

Dubey, J. P. (1976). Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature*, 262(5565), 213-214. <https://doi.org/10.1038/262213a0>

Dubey, J. P. (1998). *Toxoplasma gondii* Oocyst Survival under Defined Temperatures. *The Journal of Parasitology*, 84(4), 862-865. <https://doi.org/10.2307/3284606>

Dubey, J. P. (2001). Oocyst Shedding by Cats Fed Isolated Bradyzoites and Comparison of

- Infectivity of Bradyzoites of the VEG Strain *Toxoplasma gondii* to Cats and Mice. *The Journal of Parasitology*, 87(1), 215-219. <https://doi.org/10.2307/3285204>
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41(1), 1-16. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>
- Dubey, J. P. (2006). Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.018>
- Dubey, J. P. (2021). Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: Five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. *Parasites & Vectors*, 14(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04769-4>
- Dubey, J. P., & Almeria, S. (2019). *Cystoisospora belli* infections in humans: The past 100 years. *Parasitology*, 146(12), 1490-1527. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000957>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267-299.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., & Frenkel, J. K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *Journal of Experimental Medicine*, 132(4), 636-662. <https://doi.org/10.1084/jem.132.4.636>
- Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., & Grigg, M. E. (2020). Recent epidemiologic and clinical importance of *Toxoplasma gondii* infections in marine mammals: 2009–2020. *Veterinary Parasitology*, 288, 109296. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109296>
- Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., & Villena, I. (2021). Congenital toxoplasmosis in humans: An update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology*, 148(12), 1406-1416. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001013>
- Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., & Montoya, J. G. (2018). Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00057-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-17>
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., & Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. *The Lancet*, 353(9167), 1829-1833. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)
- Dupont, D., Lin, J.-S., Peyron, F., Akaoka, H., & Wallon, M. (2021). Chronic *Toxoplasma gondii* infection and sleep-wake alterations in mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(8), 895-907. <https://doi.org/10.1111/cns.13650>
- Duval, X., Pajot, O., Moing, V. L., Longuet, P., Ecobichon, J. L., Mentre, F., Leport, C., & Vilde, J.-L. (2004). Maintenance therapy with cotrimoxazole for toxoplasmic encephalitis in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 18(9), 1342-1344.
- Dzierszinski, F., Nishi, M., Ouko, L., & Roos, D. S. (2004). Dynamics of *Toxoplasma gondii*

- Differentiation. *Eukaryotic Cell*, 3(4), 992-1003. <https://doi.org/10.1128/EC.3.4.992-1003.2004>
- Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Dardé, M., Cohen, R., Dumètre, A., Yera, H., Gondon, E., Janaud, J., & 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(2), 280-285. <https://doi.org/10.1086/595793>
- Elyasi, H., Babaie, J., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P., Zare, M., Sadeghiani, G., Assmar, M., Pelloux, H., & Golkar, M. (2010). Use of Dense Granule Antigen GRA6 in an Immunoglobulin G Avidity Test To Exclude Acute *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(9), 1349-1355. <https://doi.org/10.1128/CVI.00199-10>
- 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 & Microbe*, 15(5), 537-550. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.002>
- Farhat, D. C., & Hakimi, M.-A. (2022). The developmental trajectories of *Toxoplasma* stem from an elaborate epigenetic rewiring. *Trends in Parasitology*, 38(1), 37-53. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.016>
- Farhat, D. C., Swale, C., Dard, C., Cannella, D., Ortet, P., Barakat, M., Sindikubwabo, F., Belmudes, L., De Bock, P.-J., Couté, Y., Bougdour, A., & Hakimi, M.-A. (2020). A MORC-driven transcriptional switch controls *Toxoplasma* developmental trajectories and sexual commitment. *Nature microbiology*, 5(4), 570-583. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0674-4>
- Fayer, R., Esposito, D. H., & Dubey, J. P. (2015). Human Infections with *Sarcocystis* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 295-311. <https://doi.org/10.1128/CMR.00113-14>
- Ferguson, D. J. P. (2002). *Toxoplasma gondii* and sex: Essential or optional extra? *Trends in Parasitology*, 18(8), 351-355. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02330-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02330-9)
- Ferguson, D. J. P., & Dubremetz, J.-F. (2014). The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (p. 19-59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00002-7>
- Ferguson, D. J. P., & Parmley, S. F. (2002). *Toxoplasma gondii* MAG1 protein expression. *Trends in Parasitology*, 18(11), 482. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02349-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02349-8)
- Fernández-Sabé, N., Cervera, C., Fariñas, M. C., Bodro, M., Muñoz, P., Gurguí, M., Torre-Cisneros, J., Martín-Dávila, P., Noblejas, A., Len, Ó., García-Reyne, A., Del Pozo, J. L., & Carratalà, J. (2012). Risk Factors, Clinical Features, and Outcomes of Toxoplasmosis in Solid-Organ Transplant Recipients: A Matched Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*, 54(3), 355-361. <https://doi.org/10.1093/cid/cir806>
- Ferreira-da-Silva, M. da F., Takács, A. C., Barbosa, H. S., Gross, U., & Lüder, C. G. K. (2009). Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(5), 381-388. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.10.002>
- Flegr, J., Havlíček, J., Kodým, P., Malý, M., & Smahel, Z. (2002). Increased risk of traffic accidents

in subjects with latent toxoplasmosis: A retrospective case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 2(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-2-11>

Ford, N., Shubber, Z., Meintjes, G., Grinsztejn, B., Eholie, S., Mills, E. J., Davies, M.-A., Vitoria, M., Penazzato, M., Nsanzimana, S., Frigati, L., O'Brien, D., Ellman, T., Ajose, O., Calmy, A., & Doherty, M. (2015). Causes of hospital admission among people living with HIV worldwide: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet HIV*, 2(10), e438-e444. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00137-X](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00137-X)

Fox, B. A., Falla, A., Rommereim, L. M., Tomita, T., Gigley, J. P., Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.-F., Weiss, L. M., & Bzik, D. J. (2011). Type II *Toxoplasma gondii* KU80 Knockout Strains Enable Functional Analysis of Genes Required for Cyst Development and Latent Infection. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1193-1206. <https://doi.org/10.1128/EC.00297-10>

Fox, B. A., Ristuccia, J. G., Gigley, J. P., & Bzik, D. J. (2009). Efficient Gene Replacements in *Toxoplasma gondii* Strains Deficient for Nonhomologous End Joining. *Eukaryotic Cell*, 8(4), 520-529. <https://doi.org/10.1128/EC.00357-08>

Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around Us. *BioScience*, 23(6), 343-352. <https://doi.org/10.2307/1296513>

Freyre, A., Bonino, J., Falcón, J., Castells, D., Correa, O., & Casaretto, A. (1999). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 81(1), 85-88. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00215-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00215-5)

Fricker-Hidalgo, H., Bailly, S., Brenier-Pinchart, M.-P., Dard, C., Jean, D., Coston, A.-L., Garnaud, C., & Pelloux, H. (2020). How to estimate time of infection with *Toxoplasma gondii* in pregnant women. Use of specific IgG and IgM kinetics by 7 techniques on 691 sera. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 96(4), 114987. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.114987>

Fricker-Hidalgo, H., Bulabois, C.-E., Brenier-Pinchart, M.-P., Hamidfar, R., Garban, F., Brion, J.-P., Timsit, J.-F., Cahn, J.-Y., & Pelloux, H. (2009). Diagnosis of Toxoplasmosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Results of DNA Detection and Serological Techniques. *Clinical Infectious Diseases*, 48(2), e9-e15. <https://doi.org/10.1086/595709>

Fricker-Hidalgo, H., Cimon, B., Chemla, C., Darde, M. L., Delhaes, L., L'Ollivier, C., Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Quinio, D., Robert-Gangneux, F., Villard, O., Villena, I., Candolfi, E., & Pelloux, H. (2013). *Toxoplasma* Seroconversion with Negative or Transient Immunoglobulin M in Pregnant Women: Myth or Reality? A French Multicenter Retrospective Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2103-2111. <https://doi.org/10.1128/JCM.00169-13>

Fricker-Hidalgo, H., L'Ollivier, C., Bosson, C., Imbert, S., Bailly, S., Dard, C., Piarroux, R., Paris, L., & Pelloux, H. (2017). Interpretation of the Elecsys Toxo IgG avidity results for very low and very high index: Study on 741 sera with a determined date of toxoplasmosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(5), 847-852. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2870-y>

Fricker-Hidalgo, H., Saddoux, C., Suchel-Jambon, A. S., Romand, S., Foussadier, A., Pelloux, H.,

- & Thulliez, P. (2006). New Vidas assay for *Toxoplasma*-specific IgG avidity : Evaluation on 603 sera. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56(2), 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.04.001>
- Friesen, J., Fleige, T., Gross, U., & Bohne, W. (2008). Identification of novel bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* genes with domains for protein–protein interactions by suppression subtractive hybridization. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157(2), 228-232. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.10.005>
- Fritz, H. M., Buchholz, K. R., Chen, X., Durbin-Johnson, B., Rocke, D. M., Conrad, P. A., & Boothroyd, J. C. (2012). Transcriptomic Analysis of *Toxoplasma* Development Reveals Many Novel Functions and Structures Specific to Sporozoites and Oocysts. *PLOS ONE*, 7(2), e29998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029998>
- Furtado, J. M., Winthrop, K. L., Butler, N. J., & Smith, J. R. (2013). Ocular toxoplasmosis I: Parasitology, epidemiology and public health. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 41(1), 82-94. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2012.02821.x>
- Gajria, B., Bahl, A., Brestelli, J., Dommer, J., Fischer, S., Gao, X., Heiges, M., Iodice, J., Kissinger, J. C., Mackey, A. J., Pinney, D. F., Roos, D. S., Stoeckert, C. J., Wang, H., & Brunk, B. P. (2008). ToxoDB: An integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D553-D556. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm981>
- Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H., Evengård, B., Álvarez-Martínez, M. J., Petersen, E., Kortbeek, L. M., Robert-Gangneux, F., Villena, I., Costache, C., Paul, M., Meroni, V., Guy, E., Chiodini, P. L., Brenier-Pinchart, M.-P., & Pelloux, H. (2020). *Toxoplasma gondii*-specific IgG avidity testing in pregnant women. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(9), 1155-1160. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.014>
- Gay, G., Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Voltaire, J., Josserand, V., Bertini, R.-L., Varesano, A., Touquet, B., De Bock, P.-J., Coute, Y., Tardieux, I., Bougdour, A., & Hakimi, M.-A. (2016). *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses. *Journal of Experimental Medicine*, 213(9), 1779-1798. <https://doi.org/10.1084/jem.20160340>
- Gazzinelli, R. T., Mendonça-Neto, R., Lilue, J., Howard, J., & Sher, A. (2014). Innate Resistance against *Toxoplasma gondii*: An Evolutionary Tale of Mice, Cats, and Men. *Cell Host & Microbe*, 15(2), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Infectious Diseases*, 17(9), 909-948. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)
- Genova, B. M. D., Wilson, S. K., Dubey, J. P., & Knoll, L. J. (2019). Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLOS Biology*, 17(8), e3000364. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364>

- Gilbert, R. E., Freeman, K., Lago, E. G., Bahia-Oliveira, L. M. G., Tan, H. K., Wallon, M., Buffolano, W., Stanford, M. R., Petersen, E., & Toxoplasmosis (EMSCOT), for T. E. M. S. on C. (2008). Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(8), e277. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000277>
- Golkar, M., Azadmanesh, K., Khalili, G., Khoshkholgh-Sima, B., Babaie, J., Mercier, C., Brenier-Pinchart, M.-P., Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2008). Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.003>
- Golkar, M., Rafati, S., Abdel-Latif, M. S., Brenier-Pinchart, M.-P., Fricker-Hidalgo, H., Sima, B. K., Babaie, J., Pelloux, H., Cesbron-Delauw, M.-F., & Mercier, C. (2007). The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection : Comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(4), 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.003>
- Gondim, L. F. P., Mineo, J. R., & Schares, G. (2017). Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. And *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology*, 144(7), 851-868. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000063>
- Gras, L., Gilbert, R. E., Wallon, M., Peyron, F., & Cortina-Borja, M. (2004). Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy : Implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiology and Infection*, 132(3), 541-548.
- Gray, D., Siepmann, K., VAN Essen, D., Poudrier, J., Wykes, M., Jainandunsing, S., Bergthorsdottir, S., & Dullforce, P. (1996). B-T Lymphocyte Interactions in the Generation and Survival of Memory Cells. *Immunological Reviews*, 150(1), 45-61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1996.tb00695.x>
- Grzybowski, M. M., Gatkowska, J. M., Dziadek, B., Dzitko, K., & Długońska, H. (2015). Human toxoplasmosis : A comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant *Toxoplasma gondii*ROP5 and ROP18 antigens. *Journal of Medical Microbiology*, 64(10), 1201-1207. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000148>
- Habegger de Sorrentino, A., López, R., Motta, P., Marinic, K., Sorrentino, A., Iliovich, E., Rubio, A. E., Quarleri, J., & Salomón, H. (2005). HLA class II involvement in HIV-associated Toxoplasmic encephalitis development. *Clinical Immunology*, 115(2), 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.01.003>
- Hadjilouka, A., & Tsaltas, D. (2020). Cyclospora Cayetanensis—Major Outbreaks from Ready to Eat Fresh Fruits and Vegetables. *Foods*, 9(11), 1703.
- Hailu, G. S., Robaa, D., Forgione, M., Sippl, W., Rotili, D., & Mai, A. (2017). Lysine Deacetylase Inhibitors in Parasites : Past, Present, and Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(12), 4780-4804. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01595>
- Håkansson, S., Morisaki, H., Heuser, J., & Sibley, L. D. (1999). Time-Lapse Video Microscopy of

Gliding Motility in *Toxoplasma gondii* Reveals a Novel, Biphasic Mechanism of Cell Locomotion □ V.
Molecular Biology of the Cell, 10, 9.

Hakimi, M., & Cannella, D. (2011). Apicomplexan parasites and subversion of the host cell microRNA pathway. *Trends in Parasitology*, 27(11), 481-486. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.07.001>

Hakimi, M.-A., Olias, P., & Sibley, L. D. (2017). *Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), 615-645. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-17>

Hald, T., Aspinall, W., Devleesschauwer, B., Cooke, R., Corrigan, T., Havelaar, A. H., Gibb, H. J., Torgerson, P. R., Kirk, M. D., Angulo, F. J., Lake, R. J., Speybroeck, N., & Hoffmann, S. (2016). World Health Organization Estimates of the Relative Contributions of Food to the Burden of Disease Due to Selected Foodborne Hazards: A Structured Expert Elicitation. *PLOS ONE*, 11(1), e0145839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145839>

Harris, M. T., Jeffers, V., Martynowicz, J., True, J. D., Mosley, A. L., & Sullivan, W. J. (2019). A novel GCN5b lysine acetyltransferase complex associates with distinct transcription factors in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 232, 111203. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111203>

Hassan, M. A., Olijnik, A.-A., Frickel, E.-M., & Saeij, J. P. (2019). Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *International Journal for Parasitology*, 49(1), 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.08.007>

He, C. Y., Shaw, M. K., Pletcher, C. H., Striepen, B., Tilney, L. G., & Roos, D. S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *The EMBO journal*, 20(3), 330-339.

He, H., Brenier-Pinchart, M.-P., Braun, L., Kraut, A., Touquet, B., Couté, Y., Tardieux, I., Hakimi, M.-A., & Bougdour, A. (2018). Characterization of a *Toxoplasma* effector uncovers an alternative GSK3/β-catenin-regulatory pathway of inflammation. *eLife*, 7, e39887. <https://doi.org/10.7554/eLife.39887>

Hedman, K., Lappalainen, M., Seppäiä, I., & Mäkelä, O. (1989). Recent Primary *Toxoplasma* Infection Indicated by a Low Avidity of Specific IgG. *The Journal of Infectious Diseases*, 159(4), 736-740. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.4.736>

Hill, D., Coss, C., Dubey, J. P., Wroblewski, K., Sautter, M., Hosten, T., Muñoz-Zanzi, C., Mui, E., Withers, S., Boyer, K., Hermes, G., Coyne, J., Jagdis, F., Burnett, A., McLeod, P., Morton, H., Robinson, D., & McLeod, R. (2011). Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology*, 97(2), 328-337. <https://doi.org/10.1645/GE-2782.1>

Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Pietkiewicz, H., Holec, L., Gąsior, A., & Myjak, P. (2005). Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Acta Parasitologica*, 50(3), 249-254.

Holec, L., Hiszczyńska-Sawicka, E., Gąsior, A., Brillowska-Dąbrowska, A., & Kur, J. (2007). Use of

MAG1 Recombinant Antigen for Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Humans. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(3), 220-225. <https://doi.org/10.1128/CVI.00419-06>

Holec-Gąsior, L. (2013). *Toxoplasma gondii* Recombinant Antigens as Tools for Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis: Current Status of Studies. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 20(9), 1343-1351. <https://doi.org/10.1128/CVI.00117-13>

Holec-Gąsior, L., & Kur, J. (2010). *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. *Experimental Parasitology*, 124(3), 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.10.010>

Holec-Gąsior, L., Kur, J., & Hiszczyńska-Sawicka, E. (2009). GRA2 and ROP1 Recombinant Antigens as Potential Markers for Detection of *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G in Humans with Acute Toxoplasmosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(4), 510-514. <https://doi.org/10.1128/CVI.00341-08>

Hong, D.-P., Radke, J. B., & White, M. W. (2017). Opposing Transcriptional Mechanisms Regulate *Toxoplasma* Development. *mSphere*, 2(1), e00347-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00347-16>

Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561-1566. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

Howe, D. K., Summers, B. C., & Sibley, L. D. (1996). Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 64(12), 5193-5198.

Hu, R.-S., He, J.-J., Elsheikha, H. M., Zhang, F.-K., Zou, Y., Zhao, G.-H., Cong, W., & Zhu, X.-Q. (2018). Differential Brain MicroRNA Expression Profiles After Acute and Chronic Infection of Mice With *Toxoplasma gondii* Oocysts. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02316>

Huang, S., Holmes, M. J., Radke, J. B., Hong, D.-P., Liu, T.-K., White, M. W., & Sullivan, W. J. (2017). *Toxoplasma gondii* AP2IX-4 Regulates Gene Expression during Bradyzoite Development. *MSphere*, 2(2), e00054-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00054-17>

Innes, E. A. (2010). A Brief History and Overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x>

Jacobs, D., Vercammen, M., & Saman, E. (1999). Evaluation of Recombinant Dense Granule Antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies and Analysis of a Major Antigenic Domain. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(1), 24-29. <https://doi.org/10.1128/CDLI.6.1.24-29.1999>

Jacobs, L., & Lunde, M. N. (1957). A Hemagglutination Test for Toxoplasmosis. *The Journal of Parasitology*, 43(3), 308-314. <https://doi.org/10.2307/3274354>

Jacot, D., Lourido, S., Meissner, M., Sheiner, L., Soldati-Favre, D., & Striepen, B. (2020). Genetic manipulation of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (p. 897-940). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00020-7>

- Jalallou, N., Bandepour, M., Khazan, H., Haghighi, A., Abdollahi, S., & Kazemi, B. (2010). Recombinant SAG1 Antigen to Detect *Toxoplasma gondii* Specific Immunoglobulin G in Human Sera by ELISA Test. *Iranian Journal of Parasitology*, 5(2), 1-9.
- Jeffers, V., Tampaki, Z., Kim, K., & Sullivan, W. J. (2018). A Latent Ability to Persist : Differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 75(13), 2355-2373. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2808-x>
- Jeninga, M., Quinn, J., & Petter, M. (2019). ApiAP2 Transcription Factors in Apicomplexan Parasites. *Pathogens*, 8(2), 47. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020047>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johnson, H. J., & Koshy, A. A. (2020). Latent Toxoplasmosis Effects on Rodents and Humans : How Much is Real and How Much is Media Hype? *MBio*, 11(2), e02164-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02164-19>
- Johnson, L. L., & Sayles, P. C. (2002). Deficient Humoral Responses Underlie Susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-Deficient Mice. *Infection and Immunity*, 70(1), 185-191. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.185-191.2002>
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., & Beck, E. (1999). Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. *Science*, 285(5433), 1573-1576. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1573>
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2010). Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. *Experimental Parasitology*, 124(1), 10-25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>
- Jones, J. L., & Holland, G. N. (2010). Annual Burden of Ocular Toxoplasmosis in the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(3), 464-465. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0664>
- Kang, H., Remington, J. S., & Suzuki, Y. (2000). Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired Expression of IFN- γ , TNF- α , and Inducible Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Immunology*, 164(5), 2629-2634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2629>
- Keeley, A., & Soldati, D. (2004). The glideosome : A molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in Cell Biology*, 14(10), 528-532. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.08.002>
- Kelen, A. E., Ayllon-Leindl, L., & Labzoffsky, N. A. (1962). Indirect fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(4), 545-554. <https://doi.org/10.1139/m62-071>
- Khan, A., Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America.

- International Journal for Parasitology*, 41(6), 645-655. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.005>
- Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J. P., Darde, M. L., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2007). Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14872-14877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702356104>
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A. L., Rizzo, L. V., Belfort, R., Vitor, R. W. A., Silveira, C., & Sibley, L. D. (2006). Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), 942-949. <https://doi.org/10.3201/eid1206.060025>
- Khan, A., Miller, N., Roos, D. S., Dubey, J. P., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Ajioka, J. W., Rosenthal, B., & Sibley, L. D. (2011). A Monomorphic Haplotype of Chromosome 1a Is Associated with Widespread Success in Clonal and Nonclonal Populations of *Toxoplasma gondii*. *MBio*, 2(6), e00228-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00228-11>
- Kijlstra, A., & Jongert, E. (2009). *Toxoplasma*-safe meat : Close to reality? *Trends in Parasitology*, 25(1), 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.008>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim, K. (2018). The Epigenome, Cell Cycle, and Development in *Toxoplasma*. *Annual Review of Microbiology*, 72(1), 479-499. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062741>
- Knoll, L. J., Tomita, T., & Weiss, L. M. (2014). Bradyzoite Development. In *Toxoplasma gondii* (p. 521-549). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00015-5>
- Köhler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J. M., Palmer, J. D., & Roos, D. S. (1997). A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites. *Science*, 275(5305), 1485-1489. <https://doi.org/10.1126/science.275.5305.1485>
- Konradt, C., Ueno, N., Christian, D. A., Delong, J. H., Pritchard, G. H., Herz, J., Bzik, D. J., Koshy, A. A., McGavern, D. B., Lodoen, M. B., & Hunter, C. A. (2016). Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nature microbiology*, 1, 16001. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.1>
- Kotresha, D., Poonam, D., Muhammad Hafiznur, Y., Saadatnia, G., Nurulhasanah, O., Sabariah, O., Tan, S. Y., Izzati Zahidah, A. K., & Rahmah, N. (2012). Recombinant proteins from new constructs of SAG1 and GRA7 sequences and their usefulness to detect acute toxoplasmosis. *Tropical Biomedicine*, 29(1), 129-137.
- Krause, P. J. (2019). Human babesiosis. *International Journal for Parasitology*, 49(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.007>
- Krishnamurthy, S., & Saeij, J. P. J. (2018). *Toxoplasma* Does Not Secrete the GRA16 and GRA24 Effectors Beyond the Parasitophorous Vacuole Membrane of Tissue Cysts. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00366>

- Lachenmaier, S. M., Deli, M. A., Meissner, M., & Liesenfeld, O. (2011). Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood–brain barrier. *Journal of neuroimmunology*, 232(0), 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.029>
- Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., & Barragan, A. (2006). Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular Microbiology*, 8(10), 1611-1623. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x>
- Leal, F. E., Cavazzana, C. L., Andrade, H. F. de, Galisteo, A. J., Mendonça, J. S. de, & Kallas, E. G. (2007). *Toxoplasma gondii* Pneumonia in Immunocompetent Subjects : Case Report and Review. *Clinical Infectious Diseases*, 44(6), e62-e66. <https://doi.org/10.1086/511871>
- Leblanc, A., Bamberger, J., Guillien, F., Benoit, A., Baufine-Ducroq, H., & Quillet, P. (1985). [Acquired toxoplasmic chorioretinitis with a late onset. *Archives francaises de pediatrie*, 42(1), 37-39.
- Lemgruber, L., Lupetti, P., Martins-Duarte, E. S., De Souza, W., & Vommoro, R. C. (2011). The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1920-1932. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01681.x>
- Levaditi, C., Schoen, R., & Sanchis Bayarri, V. (1928). L'encéphalo-myélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *C R Soc Biol*, 99, 37-40.
- Li, S., Maine, G., Suzuki, Y., Araujo, F. G., Galvan, G., Remington, J. S., & Parmley, S. (2000). Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection with a Recombinant Antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 179-184.
- Licon, M. H., Giuliano, C. J., Chakladar, S., Shallberg, L., Waldman, B. S., Hunter, C. A., & Lourido, S. (s. d.). A positive feedback loop controls *Toxoplasma* chronic differentiation. 18.
- Lindsay, D., & Dubey, J. (2011). *Toxoplasma gondii*: The changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology*, 138, 1-3. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001478>
- Ling Lau, Y., & Yik Fong, M. (2008). *Toxoplasma gondii*: Serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Experimental Parasitology*, 119(3), 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.016>
- Liu, Q., Wei, F., Gao, S., Jiang, L., Lian, H., Yuan, B., Yuan, Z., Xia, Z., Liu, B., Xu, X., & Zhu, X.-Q. (2009). *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(2), 162-166. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.07.008>
- Liu, X.-Y., Wang, Z.-D., El-Ashram, S., & Liu, Q. (2019). *Toxoplasma gondii* oocyst-driven infection in pigs, chickens and humans in northeastern China. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2121-4>
- Lopez, J., Bittame, A., Massera, C., Vasseur, V., Effantin, G., Valat, A., Buillon, C., Allart, S., Fox, B. A., Rommereim, L. M., Bzik, D. J., Schoehn, G., Weissenhorn, W., Dubremetz, J.-F., Gagnon, J., Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.-F., & Blanchard, N. (2015). Intravacuolar Membranes Regulate CD8 T Cell Recognition of Membrane-Bound *Toxoplasma gondii* Protective Antigen. *Cell Reports*,

13(10), 2273-2286. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.001>

Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M. S., Namasivayam, S., Swapna, L. S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B. P., Ajioka, J. W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J. C., Boyle, J. P., Dardé, M. L., Diaz-Miranda, M. A., Dubey, J. P., Fritz, H. M., Gennari, S. M., Gregory, B. D., ... Sibley, L. D. (2016). Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nature Communications*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>

Lu, B., Wu, S., Shi, Y., Zhang, R., Zou, L., Gao, S., Lin, M., & Zhou, Y. (2006). *Toxoplasma gondii*: Expression pattern and detection of infection using full-length recombinant P35 antigen. *Experimental Parasitology*, 113(2), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.12.014>

Lüder, C. G. K., & Rahman, T. (2017). Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. *Microbial Cell*, 4(7), 203-211. <https://doi.org/10.15698/mic2017.07.579>

Lüder, C. G. K., Reichard, U., & Gross, U. (2014). *Toxoplasma gondii* Animal Models and Therapeutics. In *Toxoplasma gondii* (p. 217-255). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00007-6>

Luft, B. J., & Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical infectious diseases*, 15(2), 211-222.

Mandelbrot, L., Kieffer, F., Sitta, R., Laurichesse-Delmas, H., Winer, N., Mesnard, L., Berrebi, A., Le Bouar, G., Bory, J.-P., Cordier, A.-G., Ville, Y., Perrotin, F., Jouannic, J.-M., Biquard, F., d'Ercole, C., Houfflin-Debarge, V., Villena, I., Thiébaud, R., Laurichesse-Delmas, H., ... Favennec, L. (2018). Prenatal therapy with pyrimethamine + sulfadiazine vs spiramycin to reduce placental transmission of toxoplasmosis: A multicenter, randomized trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 219(4), 386.e1-386.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.05.031>

Mandelbrot, L., Kieffer, F., Wallon, M., Winer, N., Massardier, J., Picone, O., Fuchs, F., Benoist, G., Garcia-Meric, P., L'Ollivier, C., Paris, L., Piarroux, R., Villena, I., & Peyron, F. (2021). Toxoplasmose pendant la grossesse: Proposition actuelle de prise en charge pratique. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*, 49(10), 782-791. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2021.03.003>

Mans, B. J., Pienaar, R., & Latif, A. A. (2015). A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 104-118. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>

Marty, P., Bongain, A., Rahal, A., Thulliez, P., Wasfi, D., Lambert, J. C., Le Fichoux, Y., & Gillet, J. Y. (1994). Prenatal diagnosis of severe fetal toxoplasmosis as a result of toxoplasmic reactivation in an HIV-1 seropositive woman. *Prenatal Diagnosis*, 14(5), 414-415. <https://doi.org/10.1002/pd.1970140514>

Matta, S. K., Rinkenberger, N., Dunay, I. R., & Sibley, L. D. (2021). *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 467-480. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00518-7>

- Mayoral, J., Shamamian, P., & Weiss, L. M. (2020). In Vitro Characterization of Protein Effector Export in the Bradyzoite Stage of *Toxoplasma gondii*. *mBio*, 11(2), e00046-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00046-20>
- Mazumder, P., Chuang, H. Y., Wentz, M. W., & Wiedbrauk, D. L. (1988). Latex agglutination test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2444-2446.
- McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., & Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature*, 381(6582), 482-482. <https://doi.org/10.1038/381482a0>
- McFadden, G. I., & Yeh, E. (2017). The apicoplast: Now you see it, now you don't. *International Journal for Parasitology*, 47(2), 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.005>
- Meireles, L. R., Ekman, C. C. J., Andrade Jr, H. F. de, & Luna, E. J. de A. (2015). Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57, 369-376. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500001>
- Mirzadeh, A., Saadatnia, G., Golkar, M., Babaie, J., & Noordin, R. (2017). Production of refolded *Toxoplasma gondii* recombinant SAG1-related sequence 3 (SRS3) and its use for serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Protein Expression and Purification*, 133, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.03.001>
- Montoya, J. G., & Remington, J. S. (1996). Toxoplasmic Chorioretinitis in the Setting of Acute Acquired Toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases*, 23(2), 277-282. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.2.277>
- Montoya, J., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363(9425), 1965-1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Mordue, D. G., & Hunter, C. A. (2020). Innate immunity to *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii* (p. 1075-1105). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00025-6>
- Morrison, D. A. (2005). How old are the extant lineages of *Toxoplasma gondii*? *Parassitologia*, 47(2), 205-214.
- Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 21-38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>
- Mouveaux, T., Roger, E., Gueye, A., Eysert, F., Huot, L., Grenier-Boley, B., Lambert, J.-C., & Gissot, M. (s. d.). Primary brain cell infection by *Toxoplasma gondii* reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology. *Open Biology*, 11(10), 210053. <https://doi.org/10.1098/rsob.210053>
- Mukhebi, A. W., Perry, B. D., & Kruska, R. (1992). Estimated economics of theileriosis control in Africa. *Preventive Veterinary Medicine*, 12(1), 73-85. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90070-V](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90070-V)
- Muniz-Feliciano, L., Grol, J. V., Portillo, J.-A. C., Liew, L., Liu, B., Carlin, C. R., Carruthers, V. B.,

- Matthews, S., & Subauste, C. S. (2013). *Toxoplasma gondii*-Induced Activation of EGFR Prevents Autophagy Protein-Mediated Killing of the Parasite. *PLOS Pathogens*, 9(12), e1003809. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003809>
- Murat, J.-B., Dard, C., Hidalgo, H. F., Dardé, M.-L., Brenier-Pinchart, M.-P., & Pelloux, H. (2013). Comparison of the Vidas System and Two Recent Fully Automated Assays for Diagnosis and Follow-Up of Toxoplasmosis in Pregnant Women and Newborns. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(8), 10.
- Naguleswaran, A., Elias, E. V., McClintick, J., Edenberg, H. J., & Jr, W. J. S. (2010). *Toxoplasma gondii* Lysine Acetyltransferase GCN5-A Functions in the Cellular Response to Alkaline Stress and Expression of Cyst Genes. *PLOS Pathogens*, 6(12), e1001232. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001232>
- Nance, J. P., Vannella, K. M., Worth, D., David, C., Carter, D., Noor, S., Hubeau, C., Fitz, L., Lane, T. E., Wynn, T. A., & Wilson, E. H. (2012). Chitinase Dependent Control of Protozoan Cyst Burden in the Brain. *PLOS Pathogens*, 8(11), e1002990. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002990>
- Nardelli, S. C., Che, F.-Y., Silmon de Monerri, N. C., Xiao, H., Nieves, E., Madrid-Aliste, C., Angel, S. O., Sullivan, W. J., Angeletti, R. H., Kim, K., & Weiss, L. M. (2013). The Histone Code of *Toxoplasma gondii* Comprises Conserved and Unique Posttranslational Modifications. *mBio*, 4(6), e00922-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00922-13>
- Narlikar, G. J., Fan, H.-Y., & Kingston, R. E. (2002). Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell*, 108(4), 475-487. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00654-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00654-2)
- Nayeri Chegeni, T., Sarvi, S., Moosazadeh, M., Sharif, M., Aghayan, S. A., Amouei, A., Hosseinienejad, Z., & Daryani, A. (2019). Is *Toxoplasma gondii* a potential risk factor for Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103751. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103751>
- Nicolle, C., & Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Seances Acad. Sci.* 148, 369-372.
- Nigro, M., Gutierrez, A., Hoffer, A. M., Clemente, M., Kaufer, F., Carral, L., Martin, V., Guarnera, E. A., & Angel, S. O. (2003). Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(4), 609-613. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00156-1)
- Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., & Kanemaki, M. (2009). An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature Methods*, 6(12), 917. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1401>
- Nogareda, F., Le Strat, Y., Villena, I., De Valk, H., & Goulet, V. (2014). Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980–2020: Model-based estimation. *Epidemiology and Infection*, 142(8), 1661-1670. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002756>

- O'Connor, B. P., Gleeson, M. W., Noelle, R. J., & Erickson, L. D. (2003). The rise and fall of long-lived humoral immunity: Terminal differentiation of plasma cells in health and disease. *Immunological Reviews*, 194(1), 61-76. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00055.x>
- Opsteegh, M., Spano, F., Aubert, D., Balea, A., Burrells, A., Cherchi, S., Cornelissen, J. B. W. J., Dam-Deisz, C., Guitian, J., Györke, A., Innes, E. A., Katzer, F., Limon, G., Possenti, A., Pozio, E., Schares, G., Villena, I., Wisselink, H. J., & van der Giessen, J. W. B. (2019). The relationship between the presence of antibodies and direct detection of *Toxoplasma gondii* in slaughtered calves and cattle in four European countries. *International Journal for Parasitology*, 49(7), 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.01.005>
- Ozgonul, C., & Besirli, C. G. (2017). Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. *Ophthalmic Research*, 57(1), 1-12. <https://doi.org/10.1159/000449169>
- Pan, M., Lyu, C., Zhao, J., & Shen, B. (2017). Sixty Years (1957–2017) of Research on Toxoplasmosis in China—An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01825>
- Panel on Biological Hazards. (2007). Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals—Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal*, *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.583>
- Parmley, S. F., Sgarlato, G. D., Mark, J., Prince, J. B., & Remington, J. S. (1992). Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1127-1133.
- Pelloux, H., Brion, J. P., Leclercq, P., & Ambroise-Thomas, P. (1992). Toxoplasmose pulmonaire contemporaine d'une primo-infection toxoplasmique au cours du SIDA. *Presse Med*, 992.
- Petersen, E., Kijlstra, A., & Stanford, M. (2012). Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation*, 20(2), 68-75. <https://doi.org/10.3109/09273948.2012.661115>
- Pfefferkorn, E. R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(3), 908-912.
- Picone, O., Fuchs, F., Benoist, G., Binquet, C., Kieffer, F., Wallon, M., Wehbe, K., Mandelbrot, L., & Villena, I. (2020). Toxoplasmosis screening during pregnancy in France: Opinion of an expert panel for the CNGOF. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 49(7), 101814. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101814>
- Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H. V., Stankiewicz, M., Andrzejewska, I., & Myjak, P. (2004). Usefulness of *Toxoplasma gondii*-Specific Recombinant Antigens in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1779-1781. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1779-1781.2004>
- Pinkerton, H., & Weinman, D. (1940). *Toxoplasma* infection in man. *Arch. Pathol.*, 30(1).
- Pittman, K. J., Aliota, M. T., & Knoll, L. J. (2014). Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. *BMC Genomics*, 15(1), 806.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-806>

Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Hasseine, L., Dardé, M.-L., & Marty, P. (2011). Toxoplasmosis and Horse Meat, France. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1327-1328. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101642>

Pusch, L., Romeike, B., Deckert, M., & Mawrin, C. (2009). Persistent *Toxoplasma* bradyzoite cysts in the brain: Incidental finding in an immunocompetent patient without evidence of a toxoplasmosis. *Clinical Neuropathology*, 28(05), 210-212. <https://doi.org/10.5414/NPP28210>

Rabaud, C., May, T., Amiel, C., Katlama, C., Leport, C., Ambroise-Thomas, P., & Canton, P. (1994). Extracerebral Toxoplasmosis in Patients Infected with HIV A French National Survey. *Medicine*, 73(6), 306-314.

Radke, J. B., Lucas, O., De Silva, E. K., Ma, Y., Sullivan, W. J., Weiss, L. M., Llinas, M., & White, M. W. (2013). ApiAP2 transcription factor restricts development of the *Toxoplasma* tissue cyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6871-6876. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300059110>

Radke, J. B., Worth, D., Hong, D., Huang, S., Jr, W. J. S., Wilson, E. H., & White, M. W. (2018). Transcriptional repression by ApiAP2 factors is central to chronic toxoplasmosis. *PLOS Pathogens*, 14(5), e1007035. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007035>

Radke, J. R., Behnke, M. S., Mackey, A. J., Radke, J. B., Roos, D. S., & White, M. W. (2005). The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biology*, 3(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-26>

Radke, J. R., Guerini, M. N., Jerome, M., & White, M. W. (2003). A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131(2), 119-127. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00198-1)

Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S., & McFadden, G. I. (2004). Metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 203-216. <https://doi.org/10.1038/nrmicro843>

Redlich, A., & Müller, W. A. (1998). Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitology Research*, 84(9), 700-706. <https://doi.org/10.1007/s004360050473>

Reichel, M. P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L. F. P., & Ellis, J. T. (2013). What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle – The billion dollar question. *International Journal for Parasitology*, 43(2), 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>

Reiter-Owona, I., Petersen, E., Joynson, D., Aspöck, H., Dardé, M. L., Disko, R., Dreazen, O., Dumon, H., Grillo, R., Gross, U., Hayde, M., Holliman, R., Ho-Yen, D. O., Janitschke, K., Jenum, P. A., Naser, K., Olszewski, M., Thulliez, P., & Seitz, H. M. (1999). The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(11), 929-935.

- Remington, J. S., & Cavanaugh, E. N. (1965). Isolation of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii* from Human Skeletal Muscle and Brain. *New England Journal of Medicine*, 273(24), 1308-1310. <https://doi.org/10.1056/NEJM196512092732404>
- Ricard, J., Pelloux, H., Pathak, S., Pipy, B., & Ambroise-Thomas, P. (1996). TNF- α enhances *Toxoplasma gondii* cyst formation in human fibroblasts through the sphingomyelinase pathway. *Cellular Signalling*, 8(6), 439-442. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(96\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(96)00079-4)
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264-296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Robert-Gangneux, F., Meroni, V., Dupont, D., Botterel, F., Garcia, J. M. A., Brenier-Pinchart, M.-P., Accoceberry, I., Akan, H., Abbate, I., Boggian, K., Bruschi, F., Carratalà, J., David, M., Drgona, L., Djurković-Djaković, O., Farinas, M. C., Genco, F., Gkrania-Klotsas, E., Groll, A. H., ... Manuel, O. (2018). Toxoplasmosis in Transplant Recipients, Europe, 2010–2014. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1497-1504. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180045>
- Robertson, L. J., Björkman, C., Axén, C., & Fayer, R. (2014). Cryptosporidiosis in Farmed Animals. In S. M. Cacciò & G. Widmer (Éds.), *Cryptosporidium : Parasite and disease* (p. 149-235). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1562-6_4
- Robin, C., Leclerc, M., Angebault, C., Redjoul, R., Beckerich, F., Cabanne, L., Foulet, F., Pautas, C., Toma, A., Maury, S., Botterel, F., & Cordonnier, C. (2019). Toxoplasmosis as an Early Complication of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 25(12), 2510-2513. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.07.035>
- Robinson, E., de Valk, H., Villena, I., Le Strat, Y., & Tourdjman, M. (2021). National perinatal survey demonstrates a decreasing seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in France, 1995 to 2016: Impact for screening policy. *Eurosurveillance*, 26(5). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.5.1900710>
- Rosenberg, A., & Sibley, L. D. (2021). *Toxoplasma gondii* secreted effectors co-opt host repressor complexes to inhibit necroptosis. *Cell Host & Microbe*, 29(7), 1186-1198.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.016>
- Rosowski, E. E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R. A., Jensen, K. D. C., & Saeij, J. P. J. (2011). Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *Journal of Experimental Medicine*, 208(1), 195-212. <https://doi.org/10.1084/jem.20100717>
- Rostami, A., Riahi, S. M., Gamble, H. R., Fakhri, Y., Nourollahpour Shiadeh, M., Danesh, M., Behniafar, H., Paktinat, S., Foroutan, M., Mokdad, A. H., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2020). Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women : A systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(6), 673-683. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.008>
- Roubille, F., Roubille, C., Lattuca, B., Gervasoni, R., Vernhet-Kovacsik, H., & Leclercq, F. (2012).

Recent Toxoplasmosis Infection With Acute Myopericarditis and Persistent Troponin Elevation in an Immunocompetent Patient. *Cardiology Research*, 3(4), 189-191. <https://doi.org/10.4021/cr200w>

Rougier, S., Montoya, J. G., & Peyron, F. (2017). Lifelong Persistence of *Toxoplasma* Cysts: A Questionable Dogma? *Trends in Parasitology*, 33(2), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.007>

Sabin, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association*, 116(9), 801-807. <https://doi.org/10.1001/jama.1941.02820090001001>

Sabin, A. B., & Feldman, H. A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108(2815), 660-663.

Saeij, J. P. J., Collier, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W., & Boothroyd, J. C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*, 445(7125), 324-327. <https://doi.org/10.1038/nature05395>

Safronova, A., Araujo, A., Camanzo, E. T., Moon, T. J., Elliott, M. R., Beiting, D. P., & Yarovinsky, F. (2019). Alarmin S100A11 initiates a chemokine response to the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Nature immunology*, 20(1), 64-72. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0250-8>

Saksouk, N., Bhatti, M. M., Kieffer, S., Smith, A. T., Musset, K., Garin, J., Sullivan, W. J., Cesbron-Delauw, M.-F., & Hakimi, M.-A. (2005). Histone-Modifying Complexes Regulate Gene Expression Pertinent to the Differentiation of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(23), 10301-10314. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10301-10314.2005>

Salvioni, A., Belloy, M., Lebourg, A., Bassot, E., Cantaloube-Ferrieu, V., Vasseur, V., Blanié, S., Liblau, R. S., Suberbielle, E., Robey, E. A., & Blanchard, N. (2019). Robust Control of a Brain-Persisting Parasite through MHC I Presentation by Infected Neurons. *Cell Reports*, 27(11), 3254-3268.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.051>

Santana, S. S., Gebrim, L. C., Carvalho, F. R., Barros, H. S., Barros, P. C., Pajuaba, A. C. A. M., Messina, V., Possenti, A., Cherchi, S., Reiche, E. M. V., Navarro, I. T., Garcia, J. L., Pozio, E., Mineo, T. W. P., Spano, F., & Mineo, J. R. (2015). CCp5A Protein from *Toxoplasma gondii* as a Serological Marker of Oocyst-driven Infections in Humans and Domestic Animals. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01305>

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. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.009>

Schaeffer, M., Han, S.-J., Chtanova, T., van Dooren, Herzmark, P., Chen, Y., Roysam, B., Striepen, B., & Robey, E. A. (2009). Dynamic Imaging of T Cell-Parasite Interactions in the Brains of Mice Chronically Infected with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 16.

Schlüter, D., & Barragan, A. (2019). Advances and Challenges in Understanding Cerebral Toxoplasmosis. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00242>

- Selleck, E. M., Orchard, R. C., Lassen, K. G., Beatty, W. L., Xavier, R. J., Levine, B., Virgin, H. W., & Sibley, L. D. (2015). A Noncanonical Autophagy Pathway Restricts *Toxoplasma gondii* Growth in a Strain-Specific Manner in IFN- γ -Activated Human Cells. *MBio*, 6(5), e01157-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01157-15>
- Selseleh, M., Keshavarz, H., Mohebal, M., Shojaee, S., Selseleh, M., Eshragian, M. R., Mansouri, F., & Modarressi, M. H. (2012). Production and Evaluation of *Toxoplasma gondii* Recombinant GRA7 for Serodiagnosis of Human Infections. *The Korean Journal of Parasitology*, 50(3), 233-238. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.3.233>
- Selseleh, M. (Mina), Keshavarz, H., Mohebal, M., Shojaee, S., Modarressi, M., Eshragian, M., & Selseleh, M. (Monavar). (2012). Production and Evaluation of *Toxoplasma gondii* Recombinant Surface Antigen 1 (SAG1) for Serodiagnosis of Acute and Chronic Toxoplasma Infection in Human Sera. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(3), 1-9.
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L. A., VanWormer, E., & Villena, I. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00049. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>
- Shen, B., Brown, K. M., Lee, T. D., & Sibley, L. D. (2014). Efficient Gene Disruption in Diverse Strains of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/CAS9. *MBio*, 5(3), e01114-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-14>
- Sibley, L. D., & Ajioka, J. W. (2008). Population Structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps. *Annual Review of Microbiology*, 62(1), 329-351. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>
- Sibley, L. D., & Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359(6390), 82-85.
- Sidik, S. M., Huet, D., Ganesan, S. M., Huynh, M.-H., Wang, T., Nasamu, A. S., Thiru, P., Saeij, J. P. J., Carruthers, V. B., Niles, J. C., & Lourido, S. (2016). A Genome-Wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell*, 166(6), 1423-1435.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.019>
- Simon, L., Fillaux, J., Guigon, A., Lavergne, R.-A., Villard, O., Villena, I., Marty, P., & Pomares, C. (2020). Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii*: Analysis of false-positive IgG results and implications. *Parasite*, 27, 7. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020006>
- Sindikubwabo, F., Ding, S., Hussain, T., Ortet, P., Barakat, M., Baumgarten, S., Cannella, D., Palencia, A., Bougdour, A., Belmudes, L., Couté, Y., Tardieux, I., Botté, C. Y., Scherf, A., & Hakimi, M. (2017). Modifications at K31 on the lateral surface of histone H4 contribute to genome structure and expression in apicomplexan parasites. *ELife*, 6, e29391. <https://doi.org/10.7554/eLife.29391>
- Skinner, L. J., Timperley, A. C., Wightman, D., Chatterton, J. M., & Ho-Yen, D. O. (1990). Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 22(3), 359-361.
- Smith, N. C., Goulart, C., Hayward, J. A., Kupz, A., Miller, C. M., & van Dooren, G. G. (2021).

Control of human toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 51(2), 95-121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001>

Smith, T. A., Lopez-Perez, G. S., Herneisen, A. L., Shortt, E., & Lourido, S. (2022). Screening the *Toxoplasma* kinome with high-throughput tagging identifies a regulator of invasion and egress. *Nature Microbiology*, 7(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01104-0>

Sobanski, V., Ajzenberg, D., Delhaes, L., Bautin, N., & Just, N. (2013). Severe Toxoplasmosis in Immunocompetent Hosts: Be Aware of Atypical Strains. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(10), 1143-1145. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1635LE>

Sonaimuthu, P., Fong, M. Y., Kalyanasundaram, R., Mahmud, R., & Lau, Y. L. (2014). Sero-diagnostic evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant Rhoptry antigen 8 expressed in *E. coli*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 297. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-297>

Souza, S. P., Splitt, S. D., Sánchez-Arcila, J. C., Alvarez, J. A., Wilson, J. N., Wizzard, S., Luo, Z., Baumgarth, N., & Jensen, K. D. C. (2021). Genetic mapping reveals *Nfkbid* as a central regulator of humoral immunity to *Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathogens*, 17(12), e1010081. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010081>

Srivastava, S., White, M. W., & Sullivan, W. J. (2020). *Toxoplasma gondii* AP2XII-2 Contributes to Proper Progression through S-Phase of the Cell Cycle. *MSphere*, 5(5), e00542-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00542-20>

Steinfeldt, T., Könen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L. D., Hunn, J. P., & Howard, J. C. (2010). Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent *Toxoplasma gondii*. *PLOS Biology*, 8(12), e1000576. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000576>

Stelzer, S., Basso, W., Benavides Silván, J., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P., Gethmann, J., Conraths, F. J., & Schares, G. (2019). *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00037. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>

Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., & Sibley, L. D. (2003). Recent Expansion of *Toxoplasma* Through Enhanced Oral Transmission. *Science*, 299(5605), 414-416. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>

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., & 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*, 109(15), 5844-5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

Sugi, T., Tu, V., Ma, Y., Tomita, T., & Weiss, L. M. (2017). *Toxoplasma gondii* Requires Glycogen Phosphorylase for Balancing Amylopectin Storage and for Efficient Production of Brain Cysts. *MBio*, 8(4), e01289-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01289-17>

Sullivan Jr., W. J., & Hakimi, M.-A. (2006). Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*.

Molecular and Biochemical Parasitology, 148(2), 109-116.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.010>

Sutterland, A. L., Fond, G., Kuin, A., Koeter, M. W. J., Lutter, R., van Gool, T., Yolken, R., Szoke, A., Leboyer, M., & de Haan, L. (2015). Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: Systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 132(3), 161-179. <https://doi.org/10.1111/acps.12423>

Suzuki, Y., Ramirez, R., Press, C., Li, S., Parmley, S., Thulliez, P., & Remington, J. S. (2000). Detection of Immunoglobulin M Antibodies to P35 Antigen of *Toxoplasma gondii* for Serodiagnosis of Recently Acquired Infection in Pregnant Women. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 3967-3970.

Suzuki, Y., Wang, X., Jortner, B. S., Payne, L., Ni, Y., Michie, S. A., Xu, B., Kudo, T., & Perkins, S. (2010). Removal of *Toxoplasma gondii* Cysts from the Brain by Perforin-Mediated Activity of CD8+ T Cells. *The American Journal of Pathology*, 176(4), 1607-1613. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090825>

Suzuki, Y., Wong, S.-Y., Grumet, F. C., Fessel, J., Montoya, J. G., Zolopa, A. R., Portmore, A., Schumacher-Perdreau, F., Schrappe, M., Köppen, S., Ruf, B., Brown, B. W., & Remington, J. S. (1996). Evidence for Genetic Regulation of Susceptibility to Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 173(1), 265-268. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.1.265>

Swierzy, I. J., & Lüder, C. G. K. (2015). Withdrawal of skeletal muscle cells from cell cycle progression triggers differentiation of *Toxoplasma gondii* towards the bradyzoite stage. *Cellular Microbiology*, 17(1), 2-17. <https://doi.org/10.1111/cmi.12342>

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1217-1258.

The SYROCOT Study Group. (2007). Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: A meta-analysis of individual patients' data. *The Lancet*, 369(9556), 115-122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60072-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60072-5)

Thomas, F., Lafferty, K. D., Brodeur, J., Elguero, E., Gauthier-Clerc, M., & Missé, D. (2012). Incidence of adult brain cancers is higher in countries where the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is common. *Biology Letters*, 8(1), 101-103. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0588>

Tomita, T., Bzik, D. J., Ma, Y. F., Fox, B. A., Markillie, L. M., Taylor, R. C., Kim, K., & Weiss, L. M. (2013). The *Toxoplasma gondii* Cyst Wall Protein CST1 Is Critical for Cyst Wall Integrity and Promotes Bradyzoite Persistence. *PLOS Pathogens*, 9(12), e1003823. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003823>

Tomita, T., Mukhopadhyay, D., Han, B., Yakubu, R., Tu, V., Mayoral, J., Sugi, T., Ma, Y., Saeij, J. P. J., & Weiss, L. M. (2021). *Toxoplasma gondii* Matrix Antigen 1 Is a Secreted Immunomodulatory Effector. *MBio*, 12(3), e00603-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00603-21>

Torgerson, P. R., & Mastroiacovo, P. (2013). The global burden of congenital toxoplasmosis: A

systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, 91, 501-508. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>

Tu, V., Mayoral, J., Sugi, T., Tomita, T., Han, B., Ma, Y. F., & Weiss, L. M. (2019). Enrichment and Proteomic Characterization of the Cyst Wall from *In Vitro Toxoplasma gondii* Cysts. *MBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00469-19>

Tu, V., Yakubu, R., & Weiss, L. M. (2018). Observations on bradyzoite biology. *Microbes and Infection*, 20(9), 466-476. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.12.003>

Uboldi, A. D., McCoy, J. M., Blume, M., Gerlic, M., Ferguson, D. J. P., Dagley, L. F., Beahan, C. T., Stapleton, D. I., Gooley, P. R., Bacic, A., Masters, S. L., Webb, A. I., McConville, M. J., & Tonkin, C. J. (2015). Regulation of Starch Stores by a Ca²⁺-Dependent Protein Kinase Is Essential for Viable Cyst Development in *Toxoplasma gondii*. *Cell Host & Microbe*, 18(6), 670-681. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.11.004>

Ueno, A., Dautu, G., Haga, K., Munyaka, B., Carmen, G., Kobayashi, Y., & Igarashi, M. (2011). *Toxoplasma gondii*: A bradyzoite-specific DnaK-tetratricopeptide repeat (DnaK-TPR) protein interacts with p23 co-chaperone protein. *Experimental Parasitology*, 127(4), 795-803. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.015>

van der Giessen, J., Deksne, G., Gómez-Morales, M. A., Troell, K., Gomes, J., Sotiraki, S., Rozycki, M., Kucsera, I., Djurković-Djaković, O., & Robertson, L. J. (2021). Surveillance of foodborne parasitic diseases in Europe in a One Health approach. *Parasite Epidemiology and Control*, 13, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00205>

VanWormer, E., Carpenter, T. E., Singh, P., Shapiro, K., Wallender, W. W., Conrad, P. A., Largier, J. L., Maneta, M. P., & Mazet, J. A. K. (2016). Coastal development and precipitation drive pathogen flow from land to sea: Evidence from a *Toxoplasma gondii* and felid host system. *Scientific Reports*, 6(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep29252>

Vastava, P. B., Pradhan, S., Jha, S., Prasad, K. N., Kumar, S., & Gupta, R. K. (2002). MRI features of toxoplasma encephalitis in the immunocompetent host: A report of two cases. *Neuroradiology*, 44(10), 834-838. <https://doi.org/10.1007/s00234-002-0852-5>

Vidal, J. E. (2019). HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*, 18. <https://doi.org/10.1177/2325958219867315>

Villena, I., Chemla, C., Quereux, C., Dupouy, D., Leroux, B., Foudrinier, F., & Pinon, J.-M. (1998). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. *Prenatal Diagnosis*, 18(10), 1079-1081. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(1998100\)18:10<1079::AID-PD391>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(1998100)18:10<1079::AID-PD391>3.0.CO;2-E)

Villena, I., & Lachaud, L. (2019). Toxoplasmose et grossesse. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2019(509), 52-59. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(19\)30037-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(19)30037-1)

Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., Fleck, D. G., Perkins, M., & Oladehin, B. (1976). A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *Journal of Clinical Pathology*, 29(2), 150-153.

<https://doi.org/10.1136/jcp.29.2.150>

Vyas, A., Kim, S.-K., Giacomini, N., Boothroyd, J. C., & Sapolsky, R. M. (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6442-6447.

Waldman, B. S., Schwarz, D., Wadsworth, M. H., Saeij, J. P., Shalek, A. K., & Lourido, S. (2020). Identification of a Master Regulator of Differentiation in *Toxoplasma*. *Cell*, S0092867419313753. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.013>

Walker, R., Gissot, M., Croken, M. M., Huot, L., Hot, D., Kim, K., & Tomavo, S. (2013). The *Toxoplasma* nuclear factor TgAP2XI-4 controls bradyzoite gene expression and cyst formation. *Molecular Microbiology*, 87(3), 641-655. <https://doi.org/10.1111/mmi.12121>

Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S., & McFadden, G. I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12352-12357.

Wallon, M., Kodjikian, L., Biquet, C., Garweg, J., Fleury, J., Quantin, C., & Peyron, F. (2004). Long-Term Ocular Prognosis in 327 Children With Congenital Toxoplasmosis. *Pediatrics*, 113(6), 1567-1572. <https://doi.org/10.1542/peds.113.6.1567>

Walls, K. W., Taraska, J. J., & Goldman, M. (1963). Isolation of *Toxoplasma gondii* from cysts in human brain. *Journal of Parasitology*, 49(6), 930-931.

Wang, J., Dixon, S. E., Ting, L.-M., Liu, T.-K., Jeffers, V., Croken, M. M., Calloway, M., Cannella, D., Hakimi, M. A., Kim, K., & Jr, W. J. S. (2014). Lysine Acetyltransferase GCN5b Interacts with AP2 Factors and Is Required for *Toxoplasma gondii* Proliferation. *PLOS Pathogens*, 10(1), e1003830. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003830>

Wang, Y., & Yin, H. (2014). Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 180. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>

Watts, E., Zhao, Y., Dhara, A., Eller, B., Patwardhan, A., & Sinai, A. P. (2015). Novel Approaches Reveal that *Toxoplasma gondii* Bradyzoites within Tissue Cysts Are Dynamic and Replicating Entities In Vivo. *mBio*, 6(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01155-15>

Wingstrand, A., Lind, P., Haugegaard, J., Henriksen, Sv. Aa., Bille-Hansen, V., & Sørensen, V. (1997). Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 72(2), 129-140. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00034-4)

Witola, W. H., Mui, E., Hargrave, A., Liu, S., Hypolite, M., Montpetit, A., Cavailles, P., Bisanz, C., Cesbron-Delauw, M.-F., Fournié, G. J., & McLeod, R. (2011). NALP1 Influences Susceptibility to Human Congenital Toxoplasmosis, Proinflammatory Cytokine Response, and Fate of *Toxoplasma gondii*-Infected Monocytic Cells. *Infection and Immunity*, 79(2), 756-766. <https://doi.org/10.1128/IAI.00898-10>

Wolf, A., Cowen, D., & Paige, B. (1939). Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an

Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.89.2306.226>

World Health Organization. (2021). *World malaria report 2021*. World Health Organization.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/350147>

Worliczek, H. L., Buggelsheim, M., Saalmüller, A., & Joachim, A. (2007). Porcine isosporosis : Infection dynamics, pathophysiology and immunology of experimental infections. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 119(S3), 33-39. <https://doi.org/10.1007/s00508-007-0859-3>

Wu, K., Chen, X.-G., Li, H., Yan, H., Yang, P.-L., Lun, Z.-R., & Zhu, X.-Q. (2009). Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(3), 261-266.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.02.009>

Yamamoto, M., Standley, D. M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., Soldati-Favre, D., & Takeda, K. (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *Journal of Experimental Medicine*, 206(12), 2747-2760.
<https://doi.org/10.1084/jem.20091703>

Yang, J., Zhang, L., Diao, H., Xia, N., Zhou, Y., Zhao, J., & Shen, B. (2017). ANK1 and DnaK-TPR, Two Tetratricopeptide Repeat-Containing Proteins Primarily Expressed in *Toxoplasma* Bradyzoites, Do Not Contribute to Bradyzoite Differentiation. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02210>

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., & Sher, A. (2005). TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. *Science*, 308(5728), 1626-1629.
<https://doi.org/10.1126/science.1109893>

Ybañez, R. H. D., & Nishikawa, Y. (2020). Serological detection of *T. gondii* infection in humans using an immunochromatographic assay based on dense granule protein 7. *Parasitology International*, 76, 102089. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102089>

Ybañez, R. H. D., Ybañez, A. P., & Nishikawa, Y. (2020). Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00204>

Ybañez, R. H., & Nishikawa, Y. (2022). Comparative Performance of Recombinant GRA6, GRA7, and GRA14 for the Serodetection of *T. gondii* Infection and Analysis of IgG Subclasses in Human Sera from the Philippines. *Pathogens*, 11(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020277>

Zhang, Y. W., Fraser, A., Balfour, A. H., Wreghitt, T. G., Gray, J. J., & Smith, J. E. (1995). Serological reactivity against cyst and tachyzoite antigens of *Toxoplasma gondii* determined by FAST-ELISA. *Journal of Clinical Pathology*, 48(10), 908-911. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.10.908>

Zhang, Y. W., Halonen, S. K., Ma, Y. F., Wittner, M., & Weiss, L. M. (2001). Initial Characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* Cyst Wall Glycoprotein. *Infection and Immunity*, 69(1), 501-507.

<https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.501-507.2001>

Zhou, Z., Zhou, R., Li, K., Wei, W., Zhang, Z., Zhu, Y., & Luan, R. (2019). The Association between *Toxoplasma gondii* Infection and Risk of Parkinson's Disease : A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2019, e8186017. <https://doi.org/10.1155/2019/8186017>

Zhu, G., Marchewka, M. J., & Keithly, J. S. (2000). *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*, 146(2), 315-321. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-2-315>

Zhu, W., Li, J., Pappoe, F., Shen, J., & Yu, L. (2019). Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00899>

Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., & Tanner, M. (2011). From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3), 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

Zulpo, D. L., Sammi, A. S., dos Santos, J. R., Sasse, J. P., Martins, T. A., Minutti, A. F., Cardim, S. T., de Barros, L. D., Navarro, I. T., & Garcia, J. L. (2018). *Toxoplasma gondii* : A study of oocyst re-shedding in domestic cats. *Veterinary Parasitology*, 249, 17-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.021>