



HAL
open science

Identification de nouveaux marqueurs par l'infection par **T. gondii.**

Julie Denis

► **To cite this version:**

Julie Denis. Identification de nouveaux marqueurs par l'infection par *T. gondii*. Parasitologie. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ117 . tel-04502040

HAL Id: tel-04502040

<https://theses.hal.science/tel-04502040>

Submitted on 13 Mar 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.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

UR7292

THÈSE présentée par :

Julie DENIS

soutenue le : **01 décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Identification de marqueurs d'une infection
par *T. gondii***

THÈSE dirigée par :

M. PFAFF Alexander

MCU-PH, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme YERA Hélène

PU-PH, Université de Limoges

M. DUMETRE Aurélien

MCU, Université de Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. SAUER Arnaud

PU-PH, Université de Strasbourg

Remerciements

A Madame YERA, Monsieur DUMETRE et Monsieur SAUER, je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse.

Aux membres du groupe de travail du pôle sérologie du CNR *Toxoplasma*, je vous remercie pour vos relectures attentives des articles en lien avec ce travail.

A Alex, merci d'avoir accepté de reprendre de façon un peu impromptue l'encadrement de ma thèse et de m'avoir recueilli dans l'équipe toxo.

A l'équipe strasbourgeoise du CNR Toxo. Odile, je ne te remercierais jamais assez pour ton accueil au CNR, pour ton optimisme sans faille, ta bienveillance et tes conseils. Chloé, Laetitia, sans vous je n'aurais jamais réussi à terminer. Votre bonne humeur, votre efficacité, vos conseils, votre écoute.... Des millions de mercis pour tout.

A tous mes collègues du diagnostic et de l'institut, passés et présents, merci de m'avoir transmis votre amour des parasites et des champignons quand j'étais un bébé interne et un piou-piou M2. Valérie, Marcela, je tiens particulièrement à vous remercier pour votre soutien, pour vos conseils avisés, pour le temps que vous m'avez permis de consacrer à cette thèse et pour votre bienveillance.

A Morgane et Pierre, merci pour toutes ces années (déjà 11 !) de pauses café, de fous rires, de moments où on râle, merci de m'avoir remonté le moral quand c'était dur et de m'avoir écouté me plaindre (assez souvent je le reconnais).

A mes amis et ma famille, merci pour tout. Je vous aime fort.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	6
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES ANNEXES	9
INTRODUCTION	11
I. L'AGENT PATHOGENE	13
1. ORGANISATION CELLULAIRE	13
2. CYCLE PARASITAIRE.....	15
3. MODE DE CONTAMINATION	16
II. LA TOXOPLASMOSE	17
1. EPIDEMIOLOGIE	17
2. MANIFESTATIONS CLINIQUES	19
a. Toxoplasmose acquise du patient immunocompétent.....	19
b. Toxoplasmose congénitale.....	19
c. Toxoplasmose de l'immunodéprimé.....	20
d. Toxoplasmose oculaire.....	21
III. DIVERSITE DES SOUCHES	21
1. CLASSIFICATIONS GENOMIQUES	22
2. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES GENOTYPES	26
3. IMPACT DU GENOTYPE SUR LES MANIFESTATIONS CLINIQUES	28
IV. REPONSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION	29
1. REPONSE IMMUNITAIRE CHEZ LA SOURIS	29
2. REPONSE ANTI-TOXOPLASMIQUE HUMAINE	32
V. FACTEURS DE VIRULENCE	34
1. INVASION DE LA CELLULE HOTE	34
2. SURVIE INTRACELLULAIRE	35
VI. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE	37
1. METHODES DIAGNOSTIQUES	37
2. STRATEGIES DIAGNOSTIQUES.....	38
3. LIMITES DU DIAGNOSTIC.....	39
OBJECTIFS	41

PREMIERE PARTIE.....	43
I. INTRODUCTION	44
II. PUBLICATION N°1 : DYNAMIC IMMUNE PROFILE IN FRENCH TOXOPLASMOSIS PATIENTS.....	46
III. DISCUSSION/CONCLUSION	55
DEUXIEME PARTIE	57
I. CONTEXTE.....	58
II. STRATEGIE N° 1	61
1. CONTEXTE	61
2. MATERIEL ET METHODE	62
3. RESULTATS.....	64
4. DISCUSSION/CONCLUSION.....	70
III. STRATEGIE N°2.....	71
1. CONTEXTE	71
2. PUBLICATION N°2	73
IV. DISCUSSION/CONCLUSION.....	98
CONCLUSION.....	104
BIBLIOGRAPHIE	105
ANNEXES.....	121

Liste des abréviations

CCL	CC motif chemokine ligand
CD	Cellules dendritiques
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
CSF	Colony-stimulating factor
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DL	Dose létale
DPN	Diagnostic pré-natal
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GC-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRA	Granule dense
GWAS	Genome-Wide Association Studies
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IRG	Interferon-stimulated genes
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MIC	Micronème
MLST	MultiLocus Sequencing Typing
MS	Microsatellite
NK	Natural Killer
NGS	Next Generation Sequencing
PNN	Polynucléaires Neutrophiles
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RON	Rhoptrie Organelle Neck
ROP	Rhoptrie Organelle Protein
SA	Semaine d'aménorrhée
SAG	Antigène de surface
SPD	Secretory pathogenesis determinants)
TC	Toxoplasmose congénitale
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TO	Toxoplasmose oculaire
VP	Vacuole parasitophore
VPP	Valeur prédictive positive
WGS	Whole Genome Sequencing

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux marqueurs utilisés dans le génotypage de <i>T. gondii</i>	22
Tableau 2 : Correspondance des classifications génomiques de <i>T. gondii</i>	25
Tableau 3 : Variation des principales cytokines étudiées <i>in vivo</i> chez l'Homme.	33
Tableau 4 : Paramètres sérologiques et situation clinique des patients testés en western blot.	63

Liste des figures

Figure 1 : Stades morphologiques de <i>T. gondii</i>	13
Figure 2 : Coupe longitudinale d'un tachyzoite de <i>T. gondii</i> (Attias <i>et al.</i> , 2020	14
Figure 3 : Cycle de <i>T. gondii</i>	16
Figure 4 : Prévalence mondiale de la toxoplasmose.....	18
Figure 6 : Structure génétique de <i>T. gondii</i>	23
Figure 7 : Répartition géographique des souches de <i>T. gondii</i> dans le monde.	27
Figure 8 : Principales voies activées dans la réponse immunitaire anti- <i>Toxoplasma</i> chez la souris.....	31
Figure 9 : Modèle d'invasion de la cellule hôte par <i>T. gondii</i>	35
Figure 10 : Cinétique d'apparition des Ig.	38
Figure 11 : Western Blot murins.....	65
Figure 12 : Western Blot de sérums humains type avéré et type présumé.....	67
Figure 13 : Western Blot humains de sérums témoins (patientes enceintes non infectées).	69

Liste des annexes

Annexe 1..... 121
Annexe 2..... 134

INTRODUCTION
La toxoplasmose, enjeux et limites du
diagnostic

La toxoplasmose est une zoonose qui concerne 25 à 30 % de la population mondiale¹. Depuis une dizaine d'années, elle est considérée comme l'un des principaux contributeurs au fardeau des maladies d'origine alimentaire²⁻⁵. En cause, *Toxoplasma gondii*, un parasite eucaryote appartenant au phylum des *Apicomplexa*.

Pour la plupart des individus, l'infection à *T. gondii* est bénigne et asymptomatique. Cependant, elle peut s'avérer particulièrement grave et même fatale pour le fœtus en cas d'infection congénitale, mais également pour les patients immunodéprimés et pour certains patients immunocompétents. La mise en place rapide d'un traitement préventif ou curatif permet de diminuer la mortalité et de limiter les manifestations cliniques⁶. Un diagnostic précoce est donc crucial pour une prise en charge optimisée de l'infection. Celui-ci comprend, entre autres, des paramètres sérologiques et moléculaires. Les stratégies de diagnostic sont bien établies dans les différentes populations à risque d'infection grave^{7,8}, néanmoins, l'arsenal des techniques disponibles reste limité.

En effet, selon le contexte clinique, le diagnostic de toxoplasmose peut s'avérer délicat, nécessitant la réalisation de sérologies de confirmation ce qui retarde le diagnostic et la mise en place d'un traitement, notamment chez la femme enceinte. De même, le diagnostic de certaines formes oculaires implique la réalisation de prélèvements biologiques invasifs. Enfin, actuellement, aucun test diagnostique n'est capable de prédire la virulence de la souche infectante. C'est pourquoi de nouveaux marqueurs précoces de l'infection aiguë, spécifiques de certaines formes ou encore du type et de la virulence de la souche apporteraient une plus-value dans le diagnostic de la toxoplasmose.

C'est dans ce contexte qu'a été réalisé ce travail de thèse qui s'est articulé autour de 2 axes : l'exploration de la dynamique de marqueurs cytokiniques de l'infection aiguë et l'identification de marqueurs indirects du type des souches de *T. gondii*.

I. L'agent pathogène

1. Organisation cellulaire

Le parasite *T. gondii* existe sous 3 formes principales (Figure 1):

- Le tachyzoïte ou forme végétative : intracellulaire obligatoire, il envahit les cellules nucléées de l'organisme et s'y multiplie au sein d'une vacuole parasitophore (VP).
- Le bradyzoïte : issu de la transformation des tachyzoïtes chez l'hôte intermédiaire, il correspond à la forme de latence du parasite. Les bradyzoïtes se regroupent par milliers sous forme de kystes au sein de VPs.
- Le sporozoïte : forme de résistance du parasite et contenu dans l'oocyste, il est issu de la reproduction sexuée qui a lieu chez l'hôte définitif et peut persister plus d'un an dans l'environnement extérieur.

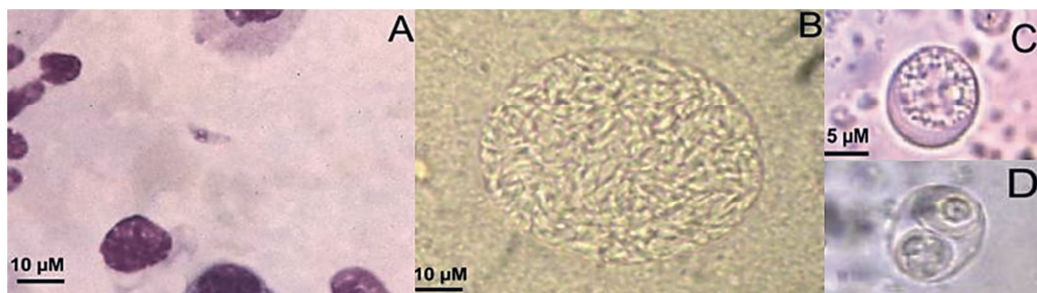


Figure 1 : Stades morphologiques de *T. gondii*.

A : tachyzoïtes (taille : 6-8 µm sur 3-4 µm) dans un liquide de lavage bronchoalvéolaire coloré au Giemsa (A) (× 500). B : kyste dans le cerveau d'une souris infectée (grossissement, × 500). C : oocyste non sporulé (× 500). D : oocyste sporulé (× 1000) (Robert-Gangneux & Dardé, 2012)⁹

T. gondii est un parasite eucaryote dont le génome d'environ 65 Mb est constitué de 13 chromosomes¹⁰. Les 3 stades du parasite sont morphologiquement très proches. De forme arquée, ils présentent une extrémité effilée et possèdent les organelles communes à toutes les cellules eucaryotes. Ils se caractérisent également par la présence d'un apicoplaste et du complexe apical,

propre aux *Apicomplexa*. Le complexe apical est un élément essentiel du parasite. Il est constitué d'un cytosquelette, d'un conoïde et de 3 organelles impliquées dans la virulence : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (Figure 2). Les micronèmes sécrètent les protéines MIC, impliquées dans la mobilité du parasite et son attachement à la cellule hôte¹¹⁻¹⁴. Les rhoptries sécrètent les protéines RON (Rhoptrie Neck Protein) et ROP (Rhoptrie Protein) qui assurent la jonction entre le parasite et la cellule hôte et participent à la formation de la VP et à l'interaction avec la cellule hôte^{15,16}. Enfin, les protéines de granules denses, les GRAs, sont impliquées dans de nombreux processus : la maturation de la VP, l'acquisition de nutriments et la régulation de la cellule hôte^{17,18}. La surface du parasite est également recouverte de protéines SAG (Surface Antigen) ou protéines de surface membranaire, essentielles à l'adhésion et à la pénétration intracellulaire du parasite.

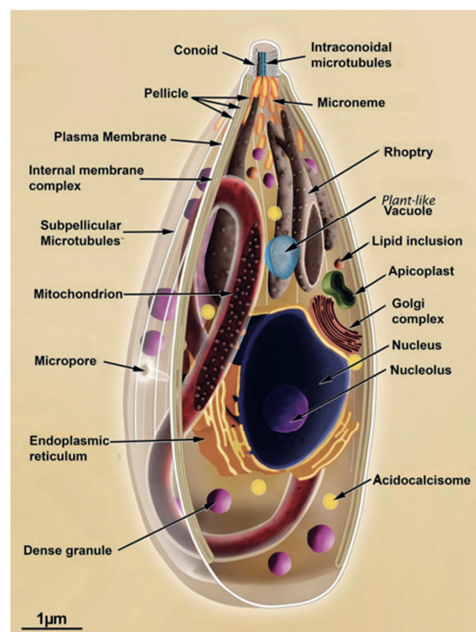


Figure 2 : Coupe longitudinale d'un tachyzoite de *T. gondii* (Attias et al., 2020¹⁹).

Cette coupe montre la présence du complexe apical composé des rhoptries, micronèmes et granule dense

2. Cycle parasitaire

Le cycle de développement de *T. gondii* fait intervenir une reproduction sexuée chez les félidés, l'hôte définitif du parasite (Figure 3). Celle-ci a lieu dans les entérocytes et mène à la production d'oocystes qui sont éliminés dans les fèces et sporulent en 1 à 5 jours dans le milieu extérieur. La reproduction asexuée a lieu chez les hôtes intermédiaires, les vertébrés homéothermes et chez l'hôte définitif. La contamination peut se faire par ingestion d'oocystes qui libèrent des sporozoïtes dans la lumière intestinale. Ceux-ci se transforment rapidement en tachyzoïtes dans les entérocytes et gagnent la circulation sanguine où ils se multiplient dans la cellule hôte. Sous la pression du système immunitaire, ils se transforment en 7 à 10 jours en bradyzoïtes, qui s'enkystent dans les tissus dans lesquels ils perdurent tout au long de la vie de l'hôte. En cas de baisse de la pression immunitaire, une reviviscence de ces kystes peut s'observer donnant lieu à une réactivation toxoplasmique.

La particularité du cycle de *T. gondii* réside dans sa capacité de transmission horizontale. En effet, les hôtes intermédiaires comme les hôtes définitifs, peuvent se contaminer lors de la consommation de viande contenant des kystes. Dans le tube digestif, ces kystes libèrent des bradyzoïtes qui se transforment en tachyzoïtes.

Il existe également une transmission verticale de la mère à l'enfant par passage de la barrière placentaire par le tachyzoïte en cas de contamination lors de la grossesse.



Figure 3 : Cycle de *T. gondii*.

L'infection et la réplique des trois stades infectieux des parasites chez leurs hôtes respectifs sont présentées ici (Hunter & Sibley, 2012²⁰)

3. Mode de contamination

Du cycle parasitaire découlent les nombreuses sources de contamination humaine. Les modes de contamination les plus fréquents sont :

- La contamination orale : par consommation d'eau ou de légumes souillés, crus et insuffisamment lavés, de viande crue ou insuffisamment cuite et également par contact avec les litières de chats contaminés.
- Le passage de la barrière placentaire.

D'autres modes de contamination moins fréquents sont également possibles comme le don d'organes infectés ou le don de sang lors de la phase de parasitémie.

II. La toxoplasmose

1. Epidémiologie

Environ un tiers de l'humanité est infectée par *T. gondii* bien que cela varie considérablement d'une population à l'autre. En effet, les séroprévalences peuvent varier de 10 à 80 % selon les régions du monde : de 30 à 50 % en Europe, environ 10 % en Amérique du nord, et 70 à 80 % en Amérique du sud (Figure 4A)^{7,9,21-23}. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces variations²³⁻²⁵ :

- Le climat : la survie des oocystes est favorisée par les climats tropicaux.
- La situation socio-économique : le manque d'accès à l'eau potable et l'insalubrité favorisent la contamination.
- Les habitudes de vie : la présence de chats domestiqués, le type de viande consommée et son mode de consommation peuvent favoriser la contamination...

L'incidence de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés est probablement sous-estimée et dépend fortement de la prévalence de l'infection. Elle reste cependant peu étudiée au niveau mondial⁸.

L'épidémiologie de la toxoplasmose congénitale (TC) est, quant à elle, mieux connue, certains pays bénéficiant de programmes de surveillance de cette infection (Réseau TOXOSURV en France)²⁶. Dans le monde, la prévalence de la TC est d'environ 1,5 cas pour 1000 naissances vivantes⁴. La séroprévalence mondiale chez les femmes enceintes est estimée à 11,2 % dans le Pacifique occidental et 45,2 % en Amérique (Figure 4B)²⁶. En France, elle diminue de façon continue depuis une vingtaine d'années, passant de 54 à 31 % entre 1995 et 2016²⁷. Cette tendance est également observée dans d'autres pays européens ainsi qu'aux Etats-unis²⁸⁻³². En France, entre 2007 et 2018, le taux de TC était d'environ 0,2-0,3 pour 1 000 naissances vivantes, soit entre 151 et 240 cas confirmés de TC par an pour 800 000 naissances vivantes²⁷. En 2021, 116 cas de TC ont été diagnostiqués en France, soit 0,17 cas pour 1000 naissances vivantes (données CNR *Toxoplasma* 2022, <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr>).

La diminution de la séroprévalence de la toxoplasmose dans les pays développés peut s'expliquer par une modification des modes de vie qui limite le contact des individus avec le parasite²⁶. Malgré cette diminution, le suivi sérologique des personnes à risque doit être poursuivi. En effet, même si la probabilité de contact avec le parasite diminue, les conséquences d'une contamination maternelle ou d'une infection aiguë de l'immunodéprimé restent les mêmes⁷. Le dépistage de la toxoplasmose reste ainsi un élément majeur de suivi des populations à risque.

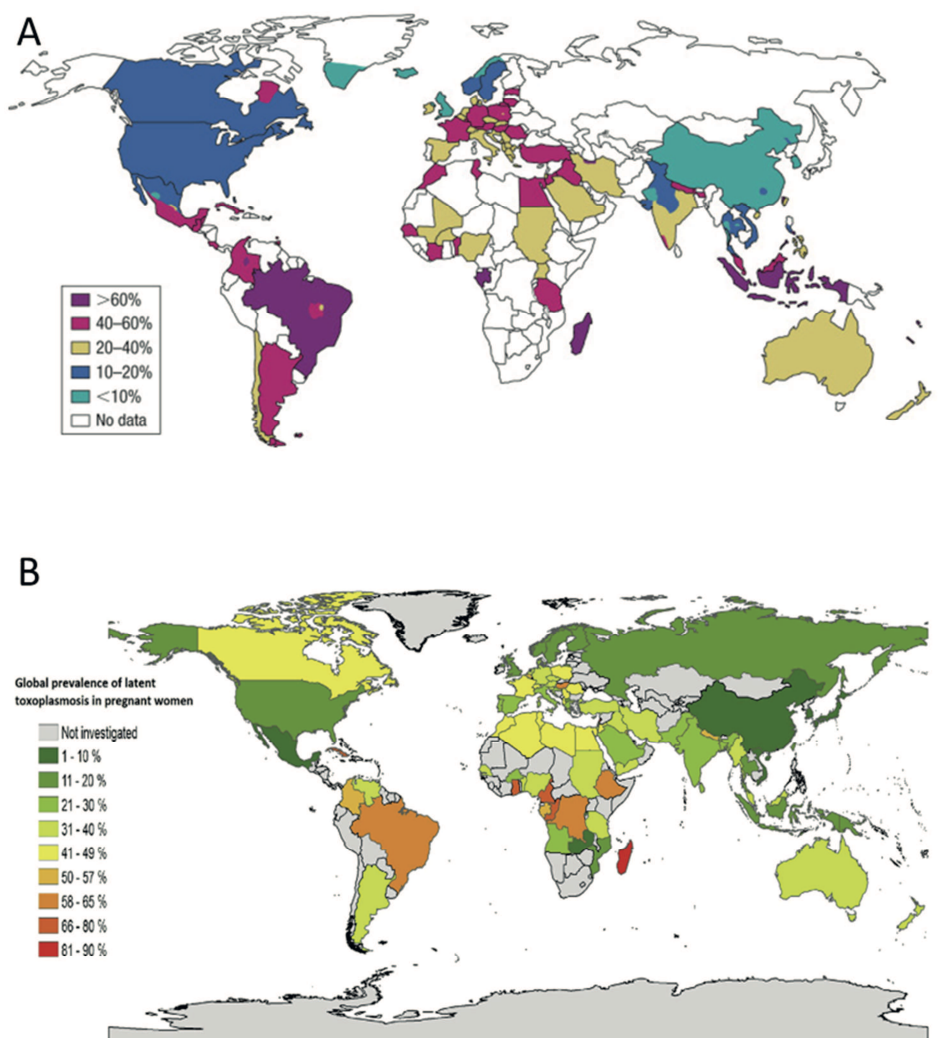


Figure 4 : Prévalence mondiale de la toxoplasmose.

A : Dans la population totale (Paris *et al.*, 2020³³). B : Chez les femmes enceintes (Rostami *et al.*, 2020³⁴)

2. Manifestations cliniques

a. Toxoplasmose acquise du patient immunocompétent

La primo-infection est le plus souvent asymptomatique. Seuls 20 % des patients présentent des symptômes : fièvre, ganglions cervicaux, éruption cutanée généralisée, asthénie, céphalées ou encore douleurs articulaires et musculaires¹. Néanmoins, quelques cas de toxoplasmose oculaire (TO) ou de formes plus sévères ont été décrits chez des patients immunocompétents^{1,9}. Après la phase d'invasion, qui correspond à la primo-infection, le parasite s'enkyste dans les tissus, notamment dans les organes immuno-privilegiés comme le cerveau et les yeux.

b. Toxoplasmose congénitale

Lors d'une primo-infection chez la femme enceinte, il existe un risque de passage trans-placentaire du parasite pouvant mener à une toxoplasmose congénitale (TC). La transmission verticale est estimée à 25 % des infections maternelles prénatales, bien que le risque augmente avec l'âge gestationnel²⁷. En effet, la perméabilité de la barrière placentaire augmente au cours de la grossesse, passant de 0-30 % les 3 premiers mois à 60-90 % au dernier trimestre³⁵ (Figure 5).

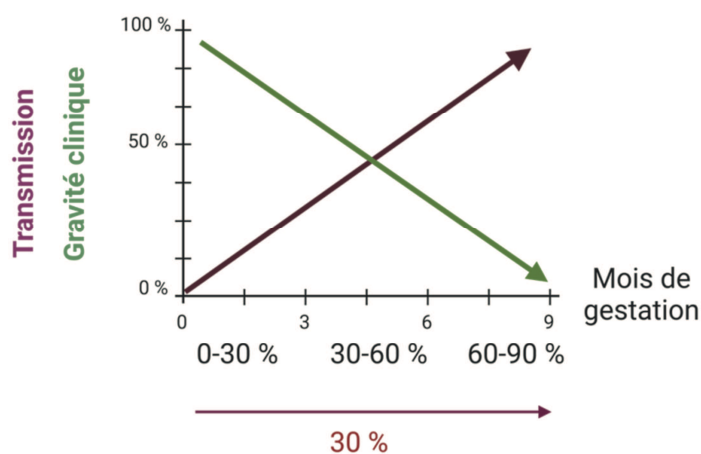


Figure 5 : Risque de transmission et gravité de la toxoplasmose congénitale.

La majorité des nouveau-nés contaminés lors de la grossesse sont asymptomatiques du fait de la mise en place d'un traitement lors de la détection de l'infection aiguë chez la mère. Cependant, des atteintes viscérales, intracrâniennes ou oculaires sont décrites. Ces atteintes sont susceptibles d'entraîner la mort du fœtus ou des séquelles graves pour l'enfant comme des convulsions, des troubles neurologiques ou des troubles visuels^{1,36}. Une chorioretinite peut également être observée plusieurs mois après la naissance, parfois pendant l'adolescence ou même à l'âge adulte^{1,37}. Les enfants atteints doivent donc bénéficier d'un suivi pour dépister au plus vite d'éventuelles séquelles de la TC²⁶.

c. Toxoplasmose de l'immunodéprimé

La toxoplasmose est une infection opportuniste avec un risque élevé de complications chez les patients immunodéprimés : VIH positifs, greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH), transplantés^{9,38}. En cas d'immunodéficience, les patients non immunisés vis-à-vis du toxoplasme sont exposés à une toxoplasmose aiguë sévère et fatale³⁹⁻⁴¹. Ceux atteints de toxoplasmose chronique risquent, quant à eux, une réactivation pouvant se compliquer d'une infection secondaire disséminée⁸.

Chez ces patients immunodéprimés, on peut observer des encéphalites, des myocardites, des pneumonies ou encore des formes disséminées^{7,42-45}. Pour les patients VIH positifs, le risque de développer une toxoplasmose est augmenté lorsque les taux de CD4 sont inférieurs à 100/mm³. Lors de greffes d'organes ou de CSH, la toxoplasmose est l'un des facteurs de comorbidité le plus fréquent. En cas de transplantation, le risque de réactivation toxoplasmique est majoré surtout lors de greffes cardiaques. Enfin, en cas de greffe d'un patient receveur séronégatif avec un organe provenant d'un donneur séropositif pour la toxoplasmose, le risque de développer une primo-infection est non négligeable^{1,7,46}.

d. Toxoplasmose oculaire

Une toxoplasmose oculaire (TO) peut survenir lors d'une primo-infection mais également en cas de réactivation toxoplasmique⁴⁷. Cliniquement, il s'agit le plus souvent d'une chorioretinite, pouvant évoluer vers une baisse de l'acuité visuelle pouvant aller jusqu'à la cécité en fonction de la localisation des lésions rétinienne. Les récurrences de TO sont fréquentes, de l'ordre de 70 à 80 %, quelle que soit la souche infectante⁴⁸.

III. Diversité des souches

Le genre *Toxoplasma* est représenté par une espèce unique au sein de laquelle il existe une diversité de souches en termes de répartition géographique et de manifestations cliniques⁴⁹⁻⁵². Historiquement, les souches étaient classées en fonction de leur phénotype de virulence chez la souris. Elles étaient alors réparties en 3 lignées clonales : les souches virulentes de type I, avirulentes de type II et de virulence intermédiaire de type III⁵³.

D'un point de vue génétique, la structure de la population de *T. gondii* est caractérisée par une diversité beaucoup plus complexe que ne le laissait supposer la classification phénotypique⁵⁴⁻⁵⁹. Celle-ci a donc été délaissée au profit de classifications génomiques.

1. Classifications génomiques

A ce jour, plusieurs classifications génomiques coexistent. Elles sont principalement basées sur l'analyse de 3 types de marqueurs : RFLP (Restriction fragment length polymorphism), MS (Microsatellites) et MLST (MultiLocus Sequencing Typings) (Tableau 1).

Technique	Marqueurs	Chromosome
RFLP (Su et al., 2006 ⁶⁰)	c22-8	Ib
	c29-2	III
	L358	V
	PK1b	VI
	SAG2	VIII
	BTUB	IX
	GRA6	X
	SAG3	XII
	Apico	Apicoplaste
MS (Ajzenberg et al., 2010 ⁶¹)	TUB2	IX
	W35	III
	TgM-A	X
	B18	VIIa
	B17	XII
	M33	IV
	IV.1	IV
	XI.1	XI
	M48	Ia
	M102	VIIa
	N60	Ib
	N82	XII
	AA	VIII
	N61	VIIb
N83	X	
MSLT (Khan et al., 2007 ⁵⁷)	UPRT	XI
	MIC2	VIIa
	β -tub	IX
	EF1	X
	HP	IV
	AP1	Apicoplaste
	AP2	Apicoplaste
	AP3	Apicoplaste

Tableau 1 : Principaux marqueurs utilisés dans le génotypage de *T. gondii*.

Le génotypage RFLP repose sur une dizaine de marqueurs répartis sur 8 chromosomes et sur un marqueur apicoplastique⁶⁰. Ce typage attribue un numéro spécifique à chaque génotype selon la codification établie par la base de données ToxoDB⁶². Le génotypage MS est basé sur l'analyse de 15 marqueurs répartis sur 11 chromosomes⁶¹ et désigne les lignées clonales en fonction de leur origine géographique (par exemple Africa, Chinese ...). Le typage MLST analyse les séquences nucléotidiques de 7 à 11 loci introniques dont des gènes de ménage^{57,59}. Enfin, plus récemment, le séquençage de génome complet (WGS-Whole Genome Sequencing) a permis de déterminer des combinaisons de marqueurs SPD (secretory pathogenesis determinants) basés sur les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) présents dans des protéines MIC, RON, ROP, GRA et SAG⁶³.

Ces différents marqueurs peuvent se combiner. Une classification résultant de ces combinaisons répartit par exemple, les souches en six clades et 16 haplogroupes^{59,63} (Figure 6).

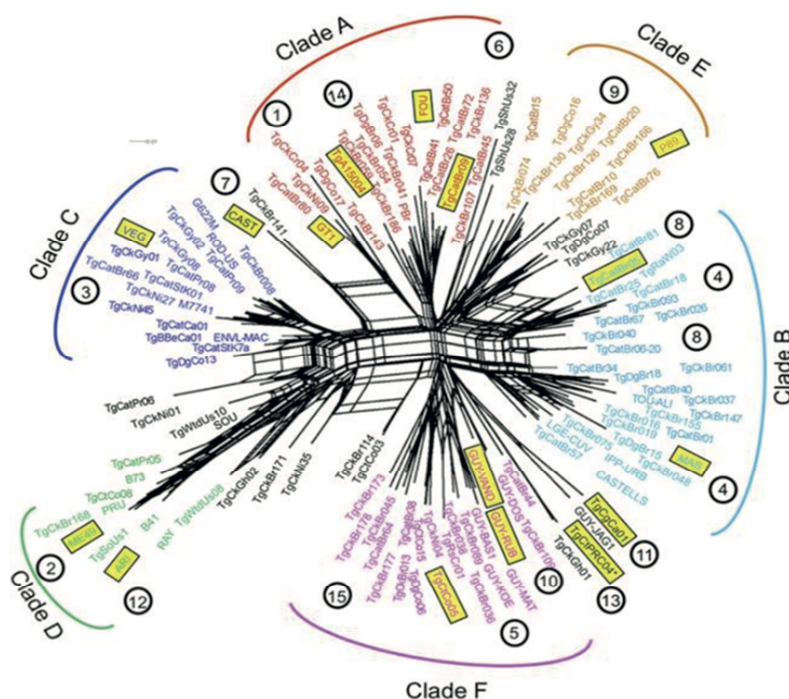


Figure 6 : Structure génétique de *T. gondii*.

La structure génétique représentée est basée sur l'analyse de réseau de 11 marqueurs RFLP, d'un marqueur pour l'apicoplaste et de quatre séquences d'intron provenant des 138 souches représentant des haplotypes uniques. Les lettres A à F correspondent aux 6 clades majeurs, les nombres encadrés correspondent aux haplogroupes, les souches en noires ne correspondent pas aux principaux clades, les souches surlignées en jaune sont représentatives de chaque haplogroupe (Su et al., 2012⁵⁹).

Certains de ces haplogroupes rassemblent des souches génétiquement homogènes appartenant à des lignées clonales, tandis que d'autres sont beaucoup plus hétérogènes. La difficulté réside alors dans la capacité à faire concorder les différentes classifications entre elles (haplogroupes, génotype, MS)⁴⁹ (Tableau 2).

En conclusion, plusieurs techniques et combinaisons de techniques ont conduit à la création de multiples classifications. Cependant, aucune classification consensus n'est validée à ce jour. Ainsi, chaque équipe utilise sa stratégie « maison » de typage rendant l'interprétation d'un résultat de génotypage délicate⁶⁴.

Clade/ Haplogroupe (WGS)	Haplogroupe (MLST)	Génotype (RFLP)	Groupes (MS)		
A1	/	91	Atypique		
		38	/		
		10	Type I		
/	1	17	Atypique		
		27;35;55	Atypique		
D2	/	139	III/II		
		127	II/III		
		1;3	Type II		
/	2	128	II		
		129	Atypique		
		2	Type III		
C3	/	73*	Atypique		
		12	Caribbean 2		
		133	Type III		
		72	Type III		
		2;7	II;III		
		13	Caribbean 1		
/	3	25*	Caribbean 3		
		26	Atypique		
		31	Caribbean 2		
		50	Type III		
		79	Atypique		
		83	III variant		
		90	Atypique		
		115;118;125;130	Atypique		
		140	type III		
		141	Caribbean 3		
		B4	/	11	Atypique
				17	Atypique
119;104	Atypique				
B8	4	47	Atypique		
/	/	17	Atypique		
		76;92;93;99;107;108;124;126	Atypique		
A15	/	106	/		
F5	5	52	Atypique		
		60;95;98;193	Amazonian		
/	/	22;37;65;100	Atypique		
A6	/	6	Africa 1		
		80;42;85	Atypique		
/	6	33;41;51;56;70;82;84;105	Atypique		
		17	/		
		86	Africa 1		
A7	7	77	Atypique		
B8	/	28	Atypique		
/	8	19	Atypique		
		32;40;59;64;69;71;75;121;	Atypique		
		53	Atypique		
		94	Atypique		

Clade/ Haplogroupe (WGS)	Haplogroupe (MLST)	Génotype (RFLP)	Groupes (MS)
B8	/	21	Atypique
C9	9	8	Atypique
		14	Atypique
		45;46;67;114;116;120;138	Atypique
/	/	78	Caribbean 1
		123	III/II
		60;97;194	Amazonian
F10	10	96	Atypique
		B4	34
D12	/	4;5	HG12
		39;49;74	HG12
		49	Atypique
D13	12	74	II/III or B18 variant
		9	Chinese 1
		/	137
A14	14	203	Africa 3
/	/	36;88	Atypique
A15	/	61	Atypique
/	/	63	Atypique
B8	15	111	Atypique
		134	III variant TUB2
		23;44;63;81;101;109;135;136	Atypique
/	/	136	/
D11	11*	197	Atypique Guiana
		66	Atypique
A15	/	43	/
/	/	20	Africa 4
/	/	54	III
/	/	112	/
/	/	29	/
/	/	132	/
/	/	16	/
/	/	102	/
/	/	62	/
/	/	57*	/
/	/	30*	/
/	/	48*	/
/	/	122*	/
/	/	131*	/
E16	16*	15;17;202	HG16

/ : Haplogroupes non définis

*Absence de correspondance entre l'analyse de réseau et l'analyse de structure des populations

Gras : concordance sur toutes les techniques

Tableau 2 : Correspondance des classifications génomiques de *T. gondii*.
Marqueurs génomiques utilisés : WGS, MLST, RFLP et MS (d'après Galal et al., 2019)⁴⁹

2. Distribution géographique des génotypes

Les différentes techniques de génotypage ont mis en évidence une structure à prédominance clonale des populations de *T. gondii* dans la plupart des régions du monde. Toutefois, un certain nombre de souches présente des génotypes non archétypaux mixtes avec un mélange d'allèles des types I, II et III ou des génotypes atypiques à allèle unique. Ces génotypes atypiques présentent une plus forte diversité génétique et ont été isolés dans certaines régions du monde où les faunes sauvages et domestiques se côtoient plus étroitement et où les conditions socio-économiques favorisent la dissémination du parasite (Figure 7) ⁶⁵.

En Europe, les souches de type II et dans une moindre mesure de type III sont largement prédominantes⁶⁶⁻⁷¹. En Amérique du Nord, les souches de type II et III sont également les plus fréquentes. L'haplogroupe 12 ainsi que quelques souches atypiques y sont également observées dans la faune sauvage^{58,59,70,72,73}. En Asie et en Afrique, les souches semblent limitées à des lignées clonales intercontinentales (types II et III) et régionales (Chinese 1, Africa 1, Africa 3) mais les données concernant ces régions sont peu nombreuses⁷⁴⁻⁷⁷. Enfin, en Amérique du Sud, on trouve quelques lignées clonales intercontinentales (type II et III) et régionales (antillaise et brésiliennes)^{74,78,79}. Ces lignées clonales cohabitent avec un nombre important de souches atypiques, présentant une forte diversité génétique comme on peut l'observer sur la carte de la distribution mondiale des différents génotypes (Figure 7) ^{58,80,81}.

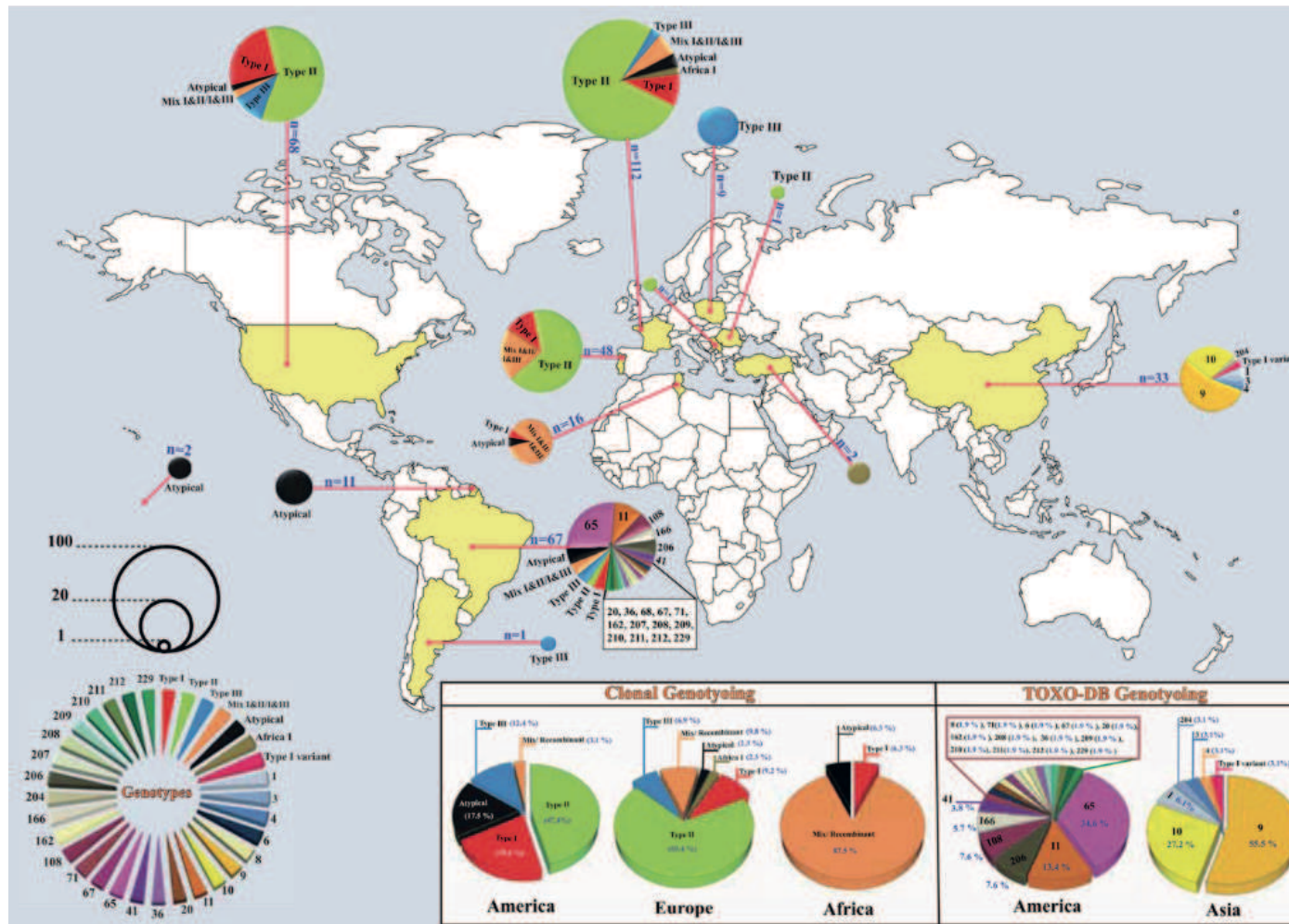


Figure 7 : Répartition géographique des souches humaines de *T. gondii* dans le monde.

La taille des cercles est corrélée avec le nombre total d'isolats pour chaque pays ; les couleurs indiquent différents génotypes (Hosseini et al., 2018⁸⁰).

3. Impact du génotype sur les manifestations cliniques

Plusieurs travaux ont relié la sévérité des manifestations cliniques au génotype des souches. Les lignées de type II et III sont généralement associées à des manifestations cliniques peu marquées tandis que les souches de type I et atypiques sont associées aux manifestations les plus graves⁸².

En Amérique du Sud, l'impact de la TC est majeur comparé à l'Europe ou l'Amérique du Nord. La mortalité des nouveau-nés atteints de TC y est plus élevée et plusieurs travaux ont montré des séquelles cliniques plus importantes chez les enfants : 35 % d'entre eux présentent une maladie neurologique grave à la naissance, 80 % des enfants développent des lésions oculaires et près de 40 % des troubles auditifs⁸³⁻⁸⁶. Les patients immunocompétents ont quant à eux, 5 fois plus de risques de développer des lésions oculaires que dans les autres régions du monde^{66,83,87-89}. D'autres travaux réalisés en Amérique du Sud et en Asie ont également observé des atteintes pulmonaires et cérébrales plus sévères, non corrélées à l'état immunitaire de l'hôte⁹⁰⁻⁹². Outre les facteurs socio-économiques et les comportements alimentaires, la sévérité clinique décrite dans ces régions pourrait s'expliquer par la présence de souches atypiques, plus virulentes⁶.

D'autres génotypes ont également été associés à des manifestations cliniques plus sévères. C'est par exemple le cas du type Africa 1, détecté pour la première fois chez des chats domestiques et qui semble présenter la même virulence que les souches de type I. Le type Africa 1 a notamment été isolé dans quelques cas de toxoplasmoses congénitales sévères⁹³⁻⁹⁶ et chez des patients immunocompétents⁹⁷.

IV. Réponse immunitaire à l'infection

La réponse immunitaire à l'infection par *T. gondii* est complexe et fait intervenir l'immunité innée et l'immunité acquise, cellulaire et humorale. Du fait du caractère aigu et chronique de l'infection, de la variabilité des formes cliniques et des co-morbidités des patients, peu d'études sont réalisées *in vivo* chez l'Homme. Toutefois, quelques travaux menés *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins ont permis d'identifier des acteurs cruciaux dans le contrôle de l'infection toxoplasmique.

1. Réponse immunitaire chez la souris

Chez la souris, l'infection par voie orale se traduit par un envahissement des entérocytes puis un passage de la barrière digestive et une dissémination du parasite par voie sanguine. L'invasion des entérocytes entraîne le recrutement de cellules immunitaires comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques (CD) et les polynucléaires neutrophiles (PNN)²⁰. La reconnaissance du parasite par les cellules de l'immunité innée est médiée par les récepteurs de type TLR, les lectines de type C et les récepteurs de type Nod et fait intervenir la voie MyD88⁹⁸. L'activation de ces récepteurs déclenche la sécrétion de nombreuses cytokines/chimiokines (Figure 8).

La voie Th1 est cruciale dans le contrôle de l'infection. Elle repose notamment sur la sécrétion de l'IL-12 par les CD et les PNN ce qui induit la sécrétion d'IFN- γ par les cellules Natural killer (NK) et les lymphocytes CD4+ et CD8+^{91,99,100}. De plus, de nombreuses études ont montré le rôle majeur de l'IFN- γ dans le contrôle de l'infection toxoplasmique chez la souris. Lors de la phase active de l'infection, cet interféron de type II est notamment impliqué dans :

- La synthèse des dérivés actifs de l'azote (iNOS et NO) par les macrophages^{20,101}.
- Le recrutement des IRGs (IFN- γ -inducible Immunity-Related GTPases) qui permettent la lyse de la VP^{17,102}.
- La synthèse d'IDO (indoleamine 2,3- dioxygénase) qui empêche l'utilisation du tryptophane par le parasite, limitant ainsi son développement¹⁰³.

Les voies Th2, Treg et Th17 sont également activées en réponse à l'infection. La régulation négative de l'axe IL-12/IFN- γ est assurée directement *via* l'IL-10 et l'IL-27¹⁰¹ et indirectement *via* l'IL-4 et l'IL-13 qui inhibent la production de NO¹⁰⁴. Ces voies participent aussi à la mise en place de la réponse immunitaire humorale qui favorise l'opsonisation des parasites extracellulaires²⁰. La réponse lymphocytaire est, quant à elle, régulée par l'IL-10, l'IL-27 et par le TGF- β , ce qui limite les effets immuno-pathologiques de l'infection, néfastes pour l'hôte¹⁰⁵. L'implication de la voie Th17 et de l'IL-17 dans l'infection toxoplasmique chez la souris est plus controversée. Certains travaux décrivent une dérégulation de l'IL-17A lors de l'infection par *T. gondii* menant à des effets cyto-pathogènes à l'origine de la symptomatologie, tandis que d'autres lui attribuent un rôle protecteur¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

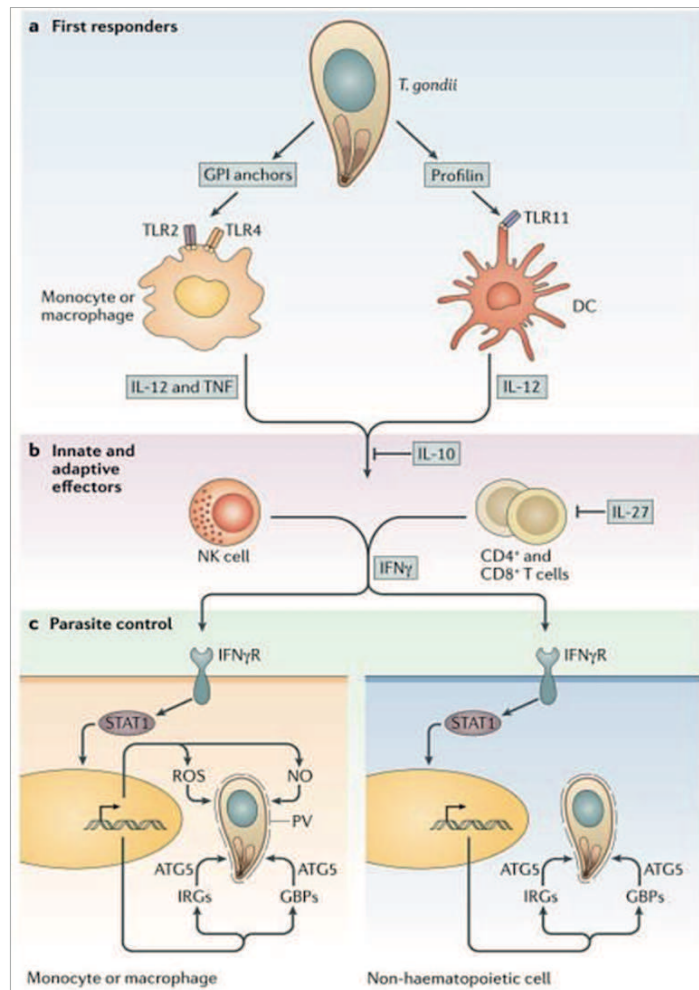


Figure 8 : Principales voies activées dans la réponse immunitaire anti-*Toxoplasma* chez la souris.

a : Reconnaissance du parasite b : Réponse immunitaire innée et adaptative. c : Voies de contrôle du parasite (Hunter & Sibley, 2012²⁰)

La réponse immunitaire innée et humorale joue un rôle important dans le contrôle de la multiplication des parasites dans les organes immuno-privilegiés¹⁰⁹. En phase chronique, la capacité des monocytes/macrophages à produire du TNF- α , du NO, de l'IL-1 et de l'IL-6 permet de protéger le tissu cérébral¹⁰⁹. Les cellules CD8 jouent également un rôle protecteur majeur dans l'infection chronique par le biais de l'IFN- γ et de l'activité cytolytique contre les cellules infectées. De plus, bien que le rôle des lymphocytes B n'ait pas été étudié en détail, des travaux ont souligné son importance dans le contrôle de l'infection chronique¹¹⁰. Enfin, il semble que la réponse immunitaire chez la souris varie en fonction de la souche infectante^{111,112}.

2. Réponse anti-toxoplasmique humaine

Chez l'Homme, les mécanismes de la réponse immunitaire à l'infection toxoplasmique sont moins bien décrits. Les résultats d'études *in vitro* menées sur l'axe IL-12/IFN- γ semblent montrer son rôle clé dans le contrôle de l'infection¹¹² notamment *via* la production des dérivés actifs de l'azote mais également de l'oxygène^{17,101}, *via* la synthèse d'IDO¹⁰³ ou encore par des mécanismes de séquestration du fer¹⁰⁸.

Quelques études se sont intéressées au cytokinome humain *in vivo* lors de l'infection toxoplasmique (Tableau 3). La plupart de ces travaux ont été menés sur des populations sud et nord-américaines de femmes enceintes. Ils ont permis de montrer une augmentation des taux de cytokines de la voie Th1 comme IFN- γ , IL-12, CXCL9, CXCL10, CXCL8, CCL5 mais aussi de cytokines de la voie Th2 comme l'IL-4 et l'IL-5 chez les patientes présentant une infection chronique vs les patientes non infectées¹¹³. Des taux significativement plus élevés de certaines cytokines ont été observés, notamment CSF2, GM-CSF, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL25 et TGF- β en phase aiguë de l'infection vs en phase chronique, suggérant leur intérêt dans la discrimination des différents stades de l'infection^{114,115}. La comparaison de patientes américaines et colombiennes lors d'une infection aiguë a montré des différences de profils cytokiniques selon l'origine des patientes, les patientes nord-américaines présentant des niveaux de cytokines plus faibles pour la plupart des médiateurs étudiés (l'IFN- γ , l'IL-17, le CCL4 et le G-CSF)¹¹⁶. Des observations similaires ont été rapportées entre des patients européens et colombiens lors de l'exploration des cytokines dans l'humeur aqueuse¹¹⁷⁻¹²⁰. Toutefois, les profils cytokiniques observés lors des toxoplasmoses oculaires semblent être différents de ceux observés chez la femme enceinte pour une même zone géographique¹¹⁴. Enfin, dans le cas de la TO, des profils différents sont observés selon le compartiment étudié, avec notamment une augmentation des taux de TGF- β sérique et une diminution de ces taux dans l'humeur aqueuse¹²⁰.

Les profils extrêmement variés de patients et les différents panels de cytokines analysés d'une étude à l'autre rendent difficile l'interprétation des résultats obtenus en termes de réponse immunitaire globale. De toute évidence, le profil de réponse des cytokines semble varier en fonction de nombreux paramètres comme le stade de l'infection, la localisation et le contexte clinique mais également selon la souche parasitaire, laissant supposer une activation de voies immunitaires différenciées selon ces facteurs¹¹⁸.

Cytokine	Femme enceinte	Nouveau-né diagnostic de TC	Toxoplasmose oculaire
IL-6	Augmentée en cas de fausse couche et TE ¹²¹	Augmentée TE vs NI ¹¹³	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷
MIG (CXCL9)	Augmentée Toxo vs NI ¹¹⁶ Augmentée TE vs TCh ¹¹⁴ Augmentée TE vs NI (Colombie) ¹¹⁶	Augmentée TE vs NI ¹¹³	NA
MCP1 (CCL2)	Augmentée TE vs NI ¹¹⁴	NA	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷ Diminuée TO vs NI ¹²² 07/02/2024 16:06:00
GMCSF (CSF2)	Diminuée TCh vs TE ¹¹⁵	NA	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷
IFN- γ	Diminuée TCh vs TE ¹¹⁵ Diminuée Toxo vs NI (EU) ¹¹⁶	NA	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷ Diminuée Colombie vs France ¹¹⁶ 07/02/2024 16:06:00
IL-12	NA	Stable TE vs NI ¹¹³	NA
IL-4	Diminuée Toxo vs NI (EU) ¹¹⁴	Augmentée TE vs NI ¹¹³	NA
IL-5	NA	Augmentée TE vs NI ¹¹³	NA
IL-10	Stable TE vs NI ¹¹⁴	Augmentée TE vs NI ¹¹³	Augmentée TO vs NI ¹²⁰ Augmentée Humeur aqueuse vs sérum ¹²⁰
IL-1b	Stable TE vs NI ¹¹⁴ Augmentée Toxo vs NI ¹²¹ 07/02/2024 16:06:00	NA	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷
GCSF (CSF3)	Diminuée Toxo vs NI (EU) ¹¹⁶	NA	Augmentée TO vs NI ¹²³
TNF- α	Diminuée Toxo vs NI (EU) ¹¹⁶	NA	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷
IL-17A	Diminuée Toxo vs NI (EU) ¹¹⁶	Stable TE vs NI ¹¹³	Stable TO vs NI ¹²⁴
TGF- β	Augmentée TE vs NI ¹¹⁵	NA	Diminuée TO vs NI (humeur aqueuse) ¹²⁰
RANTES (CCL5)	Diminuée Toxo vs NI (EU) ¹¹⁶	Augmentée TE vs NI ¹¹³	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷
IL-8	Diminuée Toxo vs NI (EU) ¹¹⁶	Augmentée TE vs NI ¹¹³	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷
IP10 (CXCL10)	Augmentée Toxo vs NI (Colombie) ¹¹⁶	Augmentée TE vs NI ¹¹³	Augmentée TO vs NI ¹¹⁷

Tableau 3 : Variation des principales cytokines étudiées *in vivo* chez l'Homme.

NI : Non infecté, TE : Toxoplasmose évolutive, TCh : Toxoplasmose chronique, TC : Toxoplasmose congénitale, TO : Toxoplasmose oculaire, EU : Etats-Unis, NA : Non applicable.

V. Facteurs de virulence

T. gondii se caractérise par la rapidité de son processus d'invasion et sa capacité de survie au sein de la VP dans la cellule tant pour s'y multiplier que pour y rester latent, à l'abri du système immunitaire. Ainsi, le parasite a développé de nombreux mécanismes de survie chez ses hôtes.

1. Invasion de la cellule hôte

L'invasion de la cellule hôte par le parasite est un facteur clé de l'infection. C'est un phénomène très rapide de l'ordre de 15 à 20 secondes qui se déroule en plusieurs étapes, auxquelles les protéines MIC, ROP/RON et GRA participent activement (Figure 9).

Le tachyzoïte s'attache tout d'abord à la cellule hôte *via* le complexe apical par un mécanisme médié par des antigènes de surface du parasite, les SAGs¹²⁵. Ce phénomène d'attachement déclenche la libération des protéines MICs par les micronèmes sous l'effet d'une augmentation de calcium intracytoplasmique¹²⁶. Les MICs sont des adhésines transmembranaires ou des protéines accessoires de ces adhésines qui agissent sous forme de complexes synergiques lors de l'attachement¹³.

Le processus d'invasion se poursuit par le relargage des RONs qui pénètrent dans la membrane de la cellule hôte pour y constituer un point d'ancrage pour le parasite¹²⁷. Ce point d'ancrage, appelé jonction mobile, est un assemblage de plusieurs protéines RON (RON2, RON4, RON5 et RON8) qui interagit avec le complexe AMA1 (Apical Membrane Antigen 1)^{13,127}.

Enfin, le parasite pénètre activement dans la cellule hôte grâce au glidéosome qui lui assure une mobilité rapide basée sur un système actine-myosine^{14,128}. Ce processus est suivi de la sécrétion des protéines GRA qui permettent de maintenir la structure et l'intégrité de la VP et d'assurer la communication avec les organelles de l'hôte^{18,129}.

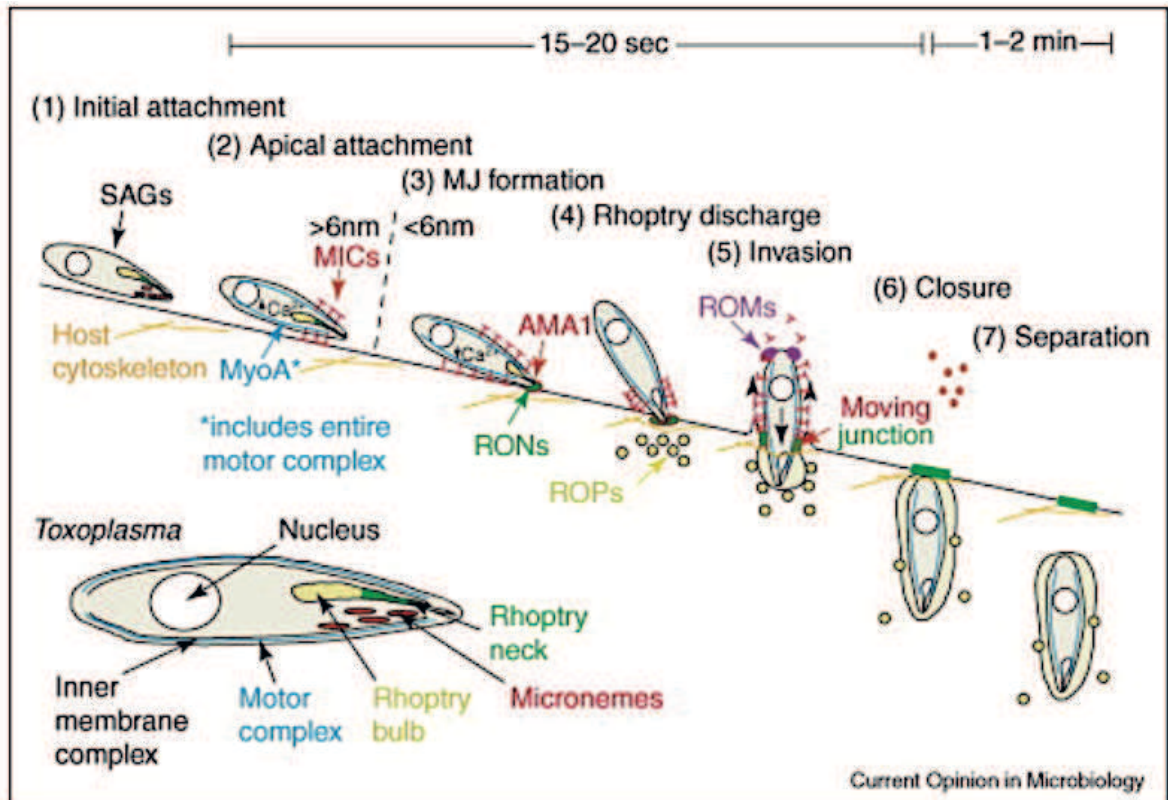


Figure 9 : Modèle d'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*.

MyoA : Myosine A (Carruthers & Boothroyd, 2007¹¹)

2. Survie intracellulaire

Pour survivre chez son hôte, le toxoplasme a développé de nombreuses stratégies basées sur la libération de protéines parasites qui interagissent avec les grandes fonctions de la cellule hôte.

Un des mécanismes de survie du parasite est sa capacité à modifier la structure de la cellule qu'il envahit pour créer un environnement propice à son développement. Pour cela, il utilise la VP qui lui permet de s'isoler du milieu intracellulaire et dont il se sert comme point de transition pour les effecteurs parasites tels que les GRAs et les ROPs. Ces protéines lui permettent de remodeler l'architecture de la cellule hôte et d'en moduler les voies de signalisation afin d'acquérir les nutriments essentiels à son développement¹³⁰. Parmi les protéines du complexe apical impliquées

dans ces processus, on trouve par exemple GRA7 qui permet de réorganiser les microtubules de l'hôte pour acheminer le cholestérol et les acides gras vers la VP¹².

Certains des effecteurs du parasite lui permettent d'échapper au système immunitaire. Parmi eux, ROP18 est une protéine de rhoptrie qui phosphoryle les IRGs recrutés par l'IFN- γ , empêchant ainsi la rupture de la membrane de la VP^{102,131,132}. La présence de ROP18 assure à elle seule le blocage de l'accumulation des IRGs sur la membrane de la VP. Plusieurs études ont montré que les souches de type II et III possèdent un allèle non virulent pour cette protéine permettant la clairance du parasite par les IRGs. Au contraire, les souches de type I présentent un allèle virulent ou une surexpression de ROP18 qui empêche la clairance du parasite¹³³⁻¹³⁶. ROP18 peut s'associer à ROP5, ROP17 et GRA7 pour former un complexe protéique qui déstabilise la voie des IRGs. De plus, ROP5 et ROP17 participent à la phosphorylation des IRGs, et GRA7 et ROP17 accélèrent leur turn-over¹⁷. Comme ROP18, les protéines ROP5 et GRA7 présentent un polymorphisme entre les souches de type II et les souches de type I/III qui module leur efficacité. Enfin, GRA6 est une protéine parasitaire localisée dans la VP qui active NFAT4 (Nuclear Factor of Activated T-cell 4) ce qui stimule la synthèse de CXCL2 et CCL2 pour le recrutement des monocytes et des PNN. Tout comme pour ROP18, on observe pour GRA6 une activation souche dépendante de NFAT4¹³⁷.

En conclusion, ce parasite module un nombre important de voies de signalisation et de facteurs de l'hôte par le biais des effecteurs qu'il sécrète. Il est intéressant de noter que les protéines de *T. gondii* identifiées comme des facteurs de virulence sont essentiellement les protéines du complexe apical : MICs, RON/ROPs, GRA ainsi que les SAGs. De plus, certaines de ces protéines possèdent un polymorphisme qui semble type-dépendant et qui expliquerait la virulence accrue de certains types de souche.

VI. Diagnostic biologique de la toxoplasmose

1. Méthodes diagnostiques

Le diagnostic direct de la toxoplasmose repose essentiellement sur la biologie moléculaire qui permet la détection du parasite grâce à l'amplification de son ADN par PCR. Ces PCR peuvent être réalisées sur des matrices variées : liquide céphalo-rachidien (LCR), lavage broncho-alvéolaire (LBA), humeur aqueuse et vitrée, sang périphérique et tout prélèvement tissulaire profond^{7,9,41,138}. La sensibilité et la spécificité de la PCR varient respectivement de 30 à 80 % et de 30 à 60 % selon les matrices et le contexte clinique. C'est une méthode de choix dans la détection du parasite en cas de suspicion de TC ainsi que dans le diagnostic des réactivations chez l'immunodéprimé^{139,140}. Cependant, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection. En cas de PCR positive, il est possible de réaliser le génotypage de la souche selon les techniques citées précédemment. Toutefois, celui-ci nécessite un ADN de bonne qualité et présent en quantité suffisante dans l'échantillon.

Le diagnostic indirect, sérologique, est basé sur la détection et la cinétique des IgM/IgA et des IgG anti-*T. gondii*⁸ (Figure 10). Différentes techniques peuvent être utilisées pour le dosage de ces immunoglobulines : l'ELISA et la CLIA pour le dépistage, l'ISAGA et le WB pour confirmer leur présence. Une mesure de l'avidité des IgG, c'est à dire de la force de liaison entre les IgG et *T. gondii* peut également être réalisée pour dater plus précisément une infection. L'avidité augmente lentement au cours des 4 premiers mois de l'infection¹⁴¹ et lorsqu'elle est élevée, elle permet de conclure à une infection ancienne (> 4-5 mois)^{8,26,141}. En cas d'avidité basse ou intermédiaire, seule la cinétique des IgG sur 2 sérums prélevés à 2-3 semaines d'intervalle permet de conclure à une infection de plus ou moins 2 à 3 mois en absence de traitement¹⁴¹. Toutefois, la maturation des IgG peut être ralentie ce qui risque de rendre plus difficile l'interprétation de son résultat⁸. Différentes

situations sérologiques sont possibles, leur interprétation se fait selon les recommandations officielle de la HAS en France¹⁴².

Dans le cas du diagnostic de TC, la sérologie fait appel à des techniques IgM et IgA validées chez le nouveau-né (ISAGA, Platelia®) et aux profils immunocomparés qui permettent de détecter les anticorps néosynthétisés par l'enfant. Le diagnostic de la toxoplasmose oculaire nécessite quant à lui la mise en évidence de la synthèse locale d'immunoglobuline dans l'humeur aqueuse à laquelle on peut associer la recherche du parasite par biologie moléculaire¹⁴².

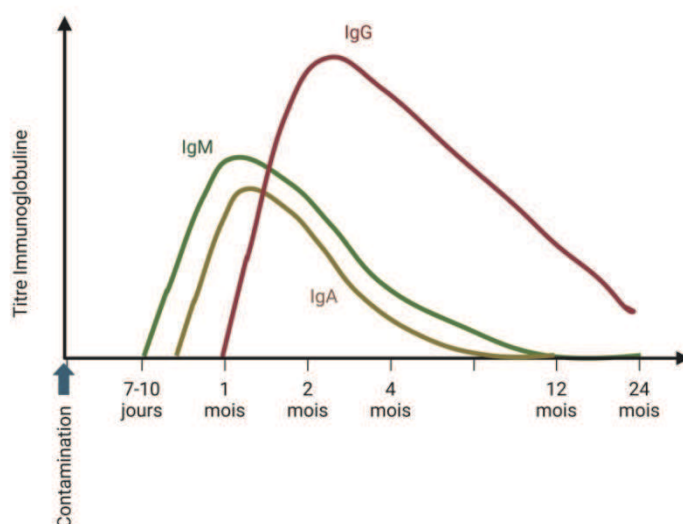


Figure 10 : Cinétique d'apparition des Ig.

2. Stratégies diagnostiques

Les stratégies de dépistage et de diagnostic sérologique de la toxoplasmose varient en fonction du pays, de la localisation clinique de l'infection et du contexte.

Chez le patient immunocompétent, le diagnostic de la toxoplasmose repose sur la sérologie IgM/A et IgG, éventuellement complétée par une mesure de l'avidité en cas de présence simultanée d'IgM et G. En France, la femme enceinte bénéficie d'une sérologie IgM et IgG de dépistage de la toxoplasmose en début de grossesse. En cas de séronégativité, des sérologies mensuelles de contrôle

sont réalisées tout au long de la grossesse et jusqu'à un mois post-partum. Si une infection est prouvée pendant la grossesse, la patiente est mise sous traitement préventif anti-toxoplasmique (spiramycine ou sulfaméthoxazole/triméthoprime) pour limiter le risque de transmission au fœtus en fonction du terme de la grossesse^{6 26}.

Le diagnostic de TC n'est réalisé qu'en cas d'infection maternelle lors de la grossesse ou en période péri-conceptionnelle. Un diagnostic pré-natal (DPN) peut être effectué, avec une recherche du parasite par biologie moléculaire dans le liquide amniotique. En cas de résultat positif, le diagnostic de TC est confirmé. En revanche, un DPN négatif ne signifie pas une absence d'infection et nécessite un dépistage toxoplasmique néo et post natal de l'enfant. La recherche d'une TC associe alors une détection du parasite par biologie moléculaire sur du sang de l'enfant et/ou sur du liquide amniotique à la naissance et un dépistage sérologique précoce comportant la recherche de la néosynthèse d'IgM et d'IgG par l'étude de profils comparés mère enfant, la recherche d'IgM/A et le suivi de la cinétique des IgG¹⁴³ (Annexe 1).

Chez le patient immunodéprimé, en absence d'IgM et d'IgG, il est important de réaliser un suivi à la recherche de signes cliniques évocateurs d'une toxoplasmose aiguë. En effet, en cas d'immunodépression profonde, la sérologie négative est à interpréter avec précaution. En cas d'infection ancienne, il est nécessaire de rechercher une réactivation devant des signes cliniques évocateurs. Une recherche du parasite par biologie moléculaire doit être réalisée en parallèle⁷.

3. Limites du diagnostic

Les techniques actuelles de diagnostic biologique de la toxoplasmose ont de bonnes performances mais présentent quelques limites.

Dans certains contextes, l'interprétation sérologique peut conduire à des conclusions erronées. C'est par exemple le cas lors d'un transfert passif d'immunoglobuline dans le cadre d'une transfusion sanguine qui peut faussement positiver les IgG. De plus, chez certains patients, des IgM résiduelles

persistent à distance de la séroconversion rendant difficile la datation de l'infection^{7,8}. Par ailleurs, l'interprétation de l'avidité des IgG basses ou intermédiaires ne permet pas de conclure quant à l'ancienneté de l'infection. Enfin, la détection par biologie moléculaire s'avère fondamentale pour le diagnostic des infections aiguës ou des réactivations chez l'immunodéprimé, toutefois, elle ne fait pas la distinction entre ces 2 entités et la sérologie peut ne pas être contributive en cas d'immunodépression profonde.

Affirmer la présence d'une infection aiguë ou ancienne et son caractère évolutif peut donc s'avérer difficile et nécessiter la réalisation de techniques de confirmation et/ou un suivi cinétique des IgG pour préciser la date de l'infection. L'allongement du temps de diagnostic peut retarder d'autant la mise en place du traitement. Or, celui-ci permet de limiter les conséquences de l'infection tant chez l'immunodéprimé que dans le cadre d'une TC. Plusieurs études ont en effet montré que la mise en place d'un traitement précoce chez la femme enceinte permet de prévenir ou de retarder la transmission de l'infection au fœtus, et d'atténuer la gravité clinique d'un passage transplacentaire²⁶. De même, une étude sur une population sud-américaine a montré qu'un traitement précoce de l'enfant réduit le risque de lésions oculaires de 78 % à 33 % au cours des 5 premières années de vie⁶. Ainsi, l'affirmation du caractère aiguë ou chronique de l'infection est fondamentale pour une prise en charge optimisée des patients.

Enfin, actuellement, il n'existe aucun moyen d'évaluer la virulence d'une souche, hormis le génotypage. Toutefois, le génotypage direct de la souche est rarement possible en dehors des patients présentant des manifestations cliniques sévères pour lesquelles les charges parasitaires sont élevées.

OBJECTIFS

Aujourd'hui, la toxoplasmose est un enjeu de santé publique majeur compte tenu de la gravité de l'infection dans certaines populations.

Les avantages et les limites ainsi que les stratégies d'utilisation des techniques de diagnostic biologique des différentes formes de l'infection sont bien établies. Toutefois, dans certaines situations, il peut s'avérer difficile de conclure quant au caractère aigu ou chronique de l'infection. Quelques études nord et sud-américaines ont montré des variations de profils de cytokines selon le stade de l'infection, permettant ainsi d'envisager l'utilisation de biomarqueurs cytokiniques pour la discrimination rapide de ces stades.

L'amélioration de la connaissance du génome du parasite a contribué à l'exploration de la diversité génétique des différentes souches, permettant d'associer génotype et virulence clinique. L'identification du génotype de la souche infectant le patient permettrait donc de prédire d'éventuels risques de complications. Cependant, à ce jour, le génotypage direct des souches de patient est limité. La mise au point de techniques indirectes de typage serait d'un précieux apport pour la connaissance de l'épidémiologie des souches de *T. gondii* et permettrait à terme d'améliorer la prise en charge des patients à risque.

L'objectif de ce travail de thèse est donc double : explorer la dynamique de l'expression des biomarqueurs cytokiniques au cours de l'infection pour permettre la discrimination des stades aigus et chroniques et développer une technique de typage indirect des souches infectantes.

PREMIERE PARTIE
Exploration des marqueurs cytokiniques
dans l'infection à *T. gondii*

I. Introduction

Depuis une quinzaine d'années, l'exploration du cytokinome de patients dans différents contextes cliniques a fait l'objet de nombreuses études. L'analyse du profil cytokinique est intéressante car elle d'obtenir une photo *in vivo* d'un panel d'effecteurs de la réponse immunitaire dans une situation et à un temps donné. Ces études ont permis de montrer que le profil cytokinique varie en fonction du terrain du patient. Les femmes enceintes, les diabétiques, les patients de réanimation... ont un profil cytokinique qui leur est propre¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Ce type d'approche permet d'explorer les mécanismes de la réponse immunitaire dans de nombreuses situations pathologiques ou non, infectieuses ou non et d'avoir un aperçu des interactions entre cytokines, par rapport aux données issues de travaux réalisés *in vitro*.

Depuis quelques années, le cytokinome intéresse également le domaine du diagnostic. En effet, certaines cytokines se sont avérées être des biomarqueurs diagnostics mais aussi pronostics dans certaines maladies. Pour exemple, le profil cytokinique de patients présentant des douleurs articulaires chroniques permet de faire la distinction entre un lupus érythémateux systémique et d'autres ostéoarthrites¹⁴⁷. Historiquement, en microbiologie, ce sont la procalcitonine, l'IL-6, l'IL-8 et plus récemment l'IL-17 qui ont été décrites comme marqueurs de sepsis. Certaines études ont ainsi corrélé l'IL-6 et l'IL-8 au pronostic infectieux dans les services de réanimation et de néonatalogie¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Plus récemment, des travaux se sont intéressés à la définition de marqueurs permettant de différencier les infections bactériennes des infections virales. Ils ont mis en évidence le potentiel de l'association de CD64/CD24/CXCR1/IFN- α pour le diagnostic des infections virales vs les infections bactériennes¹⁵¹⁻¹⁵³. D'autres études vont encore plus loin et associent des profils cytokiniques à la nature du germe, à l'efficacité d'un traitement ou à l'évolution d'une infection :

- CXCL9, CXCL10, and CXCL11 pourraient ainsi être des marqueurs de phase aiguë de brucellose¹⁵⁴.
- L'IL-10 et l'IL-6 des marqueurs du variant delta du sars-cov2¹⁵⁵.

- L'IL-6 et le TNF- α seraient corrélés à l'inefficacité du traitement de l'ulcère du Buruli¹⁵⁶.
- CXCL9 et CXCL10 seraient corrélées à l'efficacité du traitement de la tuberculose¹⁵⁷.
- L'IFN- α et IP10 pourraient être des marqueurs d'un risque élevé de survenue d'un syndrome d'hémorragie hépatique en néonatalogie lors des hantaviroses¹⁵⁸ ...

Les infections parasitaires font également l'objet d'études. Des travaux ont montré que l'IL-6 serait un biomarqueur permettant de discriminer méningites bactériennes et neuropaludisme¹⁵⁹, que l'IL-35 serait un marqueur de l'efficacité du traitement de la schistosomiase¹⁶⁰ ou encore que le taux de CXCL10 serait corrélé à la sévérité des symptômes de la trichinellose¹⁶¹.

Dans le cadre de la toxoplasmose, nous avons vu précédemment qu'il existait des profils cytokiniques corrélés à l'infection, suggérant que les cytokines pourraient être des biomarqueurs intéressants dans le diagnostic. Une multitude de profils ont déjà été décrits avec des modifications selon le stade de l'infection, sa localisation clinique, le terrain du patient mais aussi la souche^{113,114,116,117,120,162,163}. La plupart des profils décrits dans la toxoplasmose concernent des patients Nord et Sud-américains^{116,117,162}, et peu de travaux sont recensés sur des populations européennes. Les données sont donc peu transposables en Europe compte-tenu des génotypes qui y sont prédominants (type II notamment). Ces résultats ainsi que les observations réalisées pour d'autres infections ou situations cliniques suggèrent que la définition de marqueurs cytokiniques doit se faire dans un contexte bien défini : type d'infection, agent pathogène, type des souches, co-morbidité du patient...

En ce qui concerne le diagnostic de la toxoplasmose, de nouveaux biomarqueurs seraient utiles, notamment lors d'une primo-infection au cours de la grossesse. L'étude de cette population est intéressante car il s'agit de patientes bien suivies, présentant un terrain homogène et infectées par des souches de type II majoritairement. De plus, la réponse immunitaire chez la femme enceinte est peu décrite. Son exploration pourrait potentiellement mettre en lumière des nouvelles voies de réponse à l'infection par *T. gondii*. Avec l'essor des nouvelles biothérapies ciblant les cytokines, ces

voies seraient susceptibles, à terme, de constituer de nouvelles cibles pour le développement de molécules antiparasitaires.

L'objectif de ce travail est de comparer les profils cytokiniques de femmes enceintes non infectées, de femmes enceintes avec une toxoplasmose en phase aiguë et avec une toxoplasmose en phase chronique afin d'identifier des cytokines caractéristiques des différents stades de l'infection.

II. Publication n°1 : Dynamic immune profile in French toxoplasmosis patients

Authors contributions

JD: Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Software, Visualization, Data Writing – original draft, Writing – review and editing. LB/CG/TS: Formal analysis, Writing – review. AP: Supervision, Visualization, Data Writing – original draft, Writing – review. OV: Supervision, Funding acquisition Writing – review

Dynamic Immune Profile in French Toxoplasmosis Patients

Julie Denis,^{1,2} Chloé Gommenginger,^{2,3} Teodora Strehie,^{1,3} Denis Filisetti,^{1,2,3} Laetitia Beal,^{2,3} Alexander W. Pfaff,^{1,2} and Odile Villard^{1,2,3}

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, UR7292 Dynamique des Interactions Hôte Pathogène, Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ²Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, Les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; and ³Centre National de Référence Toxoplasmose-Pôle sérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Background. *Toxoplasma gondii* infection is usually benign in Europe due to the strong predominance of type II strains. Few studies have been conducted to examine the immunological course of infection in humans and have yielded conflicting results, maybe influenced by heterogeneous parasite strains.

Methods. We measured 23 immune mediators in 39, 40, and 29 sera of French noninfected, acutely infected, and chronically infected immunocompetent pregnant women, respectively.

Results. Four different cytokine patterns were identified regarding their dynamics through infection phases. For 11 of the cytokines (IFN- β , IFN- γ , IL-4, IL5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, CXCL9, CCL2, and CSF2) the serum levels were significantly elevated during acute infection. The inflammatory mediators IL-1 β , IL-17A, IL-18, TNF- α , and CSF3 remained unchanged during acute infection, while they were significantly lower in chronically infected compared to noninfected patients. As for the anti-inflammatory cytokines TGF- β and CCL5, their levels remained significantly elevated during chronic infection. We also observed a significant negative correlation of several cytokine concentrations with IgG levels, indicating a rapid decline of serum concentrations during the acute phase.

Conclusions. These results indicate an anti-inflammatory pattern in chronically infected patients in a type II dominated setting and demonstrate the highly dynamic immune situation during acute infection.

Keywords. *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis; acute; chronic; cytokine profile; cytokines; pregnant; France.

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan parasite, belonging to the Apicomplexa phylum. Humans become infected by ingesting contaminated undercooked meat or raw food, through the maternal-fetal route [1], or, more rarely, during the transplantation of contaminated organs [2]. Infection is mostly asymptomatic in immunocompetent patients in Europe, due to a nearly clonal distribution of the relatively avirulent type II strains. In other geographical areas, notably South America, a great diversity of strains frequently causes more severe infections [3,4]. Primary infection during pregnancy can be complicated by maternal-fetal transmission, responsible for congenital toxoplasmosis. After the acute infection phase, toxoplasmosis evolves into a chronic infection during which

the parasites become encysted in the brain and other organs where they remain in a latent form, probably for lifetime of the infected person. Reactivation of these encysted parasites can occur in cases of immunosuppression and can result in pulmonary [5], cerebral [6], or ocular disease, the latter also being observed in immunocompetent patients [7].

Despite the infections often being subclinical, *T. gondii* infection induces a strong immune response, as was demonstrated in animal studies [8]. Recognition of the parasite through Toll-like receptor (TLR) signaling activates the production and secretion of many proinflammatory cytokines that play a major role in the infection control [9,10], such as interleukin 1 (IL-1), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, IL-12 or, more controversially, IL-17A [11–14].

In human studies in patients with an established infection status, no conclusive data have been obtained so far. Most of these studies were carried out in South America, where more virulent strains result in more obvious clinical cases. In these studies, numerous cytokines, such as C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9), CXCL10, CXCL8 (IL-8), CC chemokine ligand 5 (CCL5), but also T helper 2 (Th2) or downregulatory cytokines, like IL-4, IL-5, and IL-10, were found to be increased in patients chronically infected with *T. gondii* versus noninfected patients [15]. Other studies have looked more specifically at acute and chronic infections and found significantly higher

Received 09 May 2022; editorial decision 13 July 2022; published online 18 August 2022
Correspondence: Julie Denis, PharmD, Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France (denisj@unistra.fr).

The Journal of Infectious Diseases® 2022;226:1834–41

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiac305>

levels of colony-stimulating factor 2 (CSF2), granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), CXCL11, transforming growth factor- β (TGF- β), CXCL9, and CXCL10 in the acute infection phase compared to the chronic phase [16,17]. CXCL9, CCL25, and CSF2 were even reported to distinguish between acute and chronic toxoplasmosis with an accuracy of 76% [17].

Clearly, the cytokine profile of response to toxoplasmosis seems to vary according to many parameters, such as the infection stage, the underlying clinical conditions, but also crucially the parasite strain [18]. These studies were often conducted in cohorts of pregnant women, which certainly introduced some bias but has the great advantage of providing a quite homogeneous and clinically well-defined group. One study compared a US cohort, where approximately 50% of infections were due to type II strains, with a similar Colombian cohort, where the setting was highly variable and more pathological [3]. Surprisingly, the North American patients showed decreased levels of half of the immune mediators, including IFN- γ , IL-17, CCL4, and CSF3 (G-CSF), during acute infection, while in Colombian patients, only few mediator levels were decreased during acute infection and some others were elevated.

Thus, although the cytokinome in infected patients has been well studied in South America and partly in the United States, these studies always include the uncertainty of strain variations. To characterize this cytokinome in a nearly homogenous type II setting, we therefore evaluated the cytokine profile of European pregnant women, infected or not with toxoplasmosis. In addition to distinguishing between acute and chronic infections, we also took into account the evolution of the acute phase by quantifying immunoglobulin G (IgG) antibody levels and avidity [19]. This allowed us to demonstrate the dynamics of cytokine responses during the course of the acute phase of infection.

METHODS

Patients

In this retrospective study, we collected sera from pregnant women who took part in routine toxoplasmosis serological screening at the Strasbourg University Hospitals, France, and who did not present any underlying pathology or signs of immunosuppression. Overall, 108 sera from 101 pregnant women were included in this study between 2011 and 2021. Toxoplasmosis serological screening consisted of an IgM assay (ARCHITECT Toxo IgM; Abbott) and an IgG assay (ARCHITECT Toxo IgG; Abbott), as well as an IgG avidity measurement in those patients with positive IgM and IgG levels (ARCHITECT Toxo IgG Avidity; Abbott) [19]. IgM were considered negative below 0.5 IU/mL, equivocal between 0.5 and 0.6 IU/mL, and positive above 0.6 IU/mL. IgG were considered negative below 1.5 IU/mL, equivocal between 1.6 and 3 IU/mL, and positive above 3 IU/mL. Avidity was considered weak below 40% and high above 60%. The patients were accordingly

classified into 3 groups: 39 patients not infected with toxoplasmosis (IgM and IgG negative), 40 sera of 33 patients with acute-phase toxoplasmosis (IgM positive and/or IgG weakly positive and avidity below 40%), and 29 patients with chronic toxoplasmosis (IgM negative, IgG positive).

Serum Cytokine Assay

The sera were stored at -20°C . The following 23 cytokines were measured on the Luminex MAGPIX system: IL-17, CCL5, CSF3, CSF2, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8, CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CXCL9 (MIG), TNF- α , and TGF- β (PROCARTAPLEX Luminex kit). Assays were performed in duplicate on 25 μL of serum and analyzed using the Luminex XPONENT software version 4.2.

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism version 8.2. Nonparametric tests were used throughout, as a preliminary test showed a nonnormal distribution of cytokine levels. The comparisons between the noninfected, acutely infected, and chronically infected groups were performed using a Kruskal-Wallis test with Dunn correction for multiple comparisons. Correlations between *Toxoplasma*-specific IgG and cytokine levels were analyzed by Spearman correlation test. The Spearman test was also used to explore the correlation between avidity and IgM or IgG levels. *P* values $<.05$ were considered as statistically significant.

Ethics Approval

The serum samples were obtained in compliance with the quality assurance scheme and legal policies. They are part of a biobank of the Strasbourg University Hospital that has been authorized by the local Clinical Research Department and declared to the French Ministry of Health (No. DC-2019-3727).

RESULTS

In our cohort, 39, 33, and 29 patients (39, 40, and 29 sera) were classified as not infected with *T. gondii*, acutely infected, and chronically infected, respectively. The patients' data are summarized in [Supplementary Figure 1](#).

The levels of 23 cytokines were measured in the sera of these patients. We first compared the levels in each of the 3 infection groups ([Figure 1](#) and [Table 1](#)). Four distinct patterns were identified. The first pattern (pattern A) comprised half of the examined mediators, including major Th1, Th2, and regulatory cytokines, namely IFN- γ , IL-12p70, CSF2, CXCL9, CCL2, IFN- β , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, and IL-15 ([Figure 1A](#)). These mediators were significantly upregulated in the sera from patients with acute toxoplasmosis. In chronically infected patients, cytokine levels returned to preinfection values, so that the noninfected and chronic groups were not statistically different. The

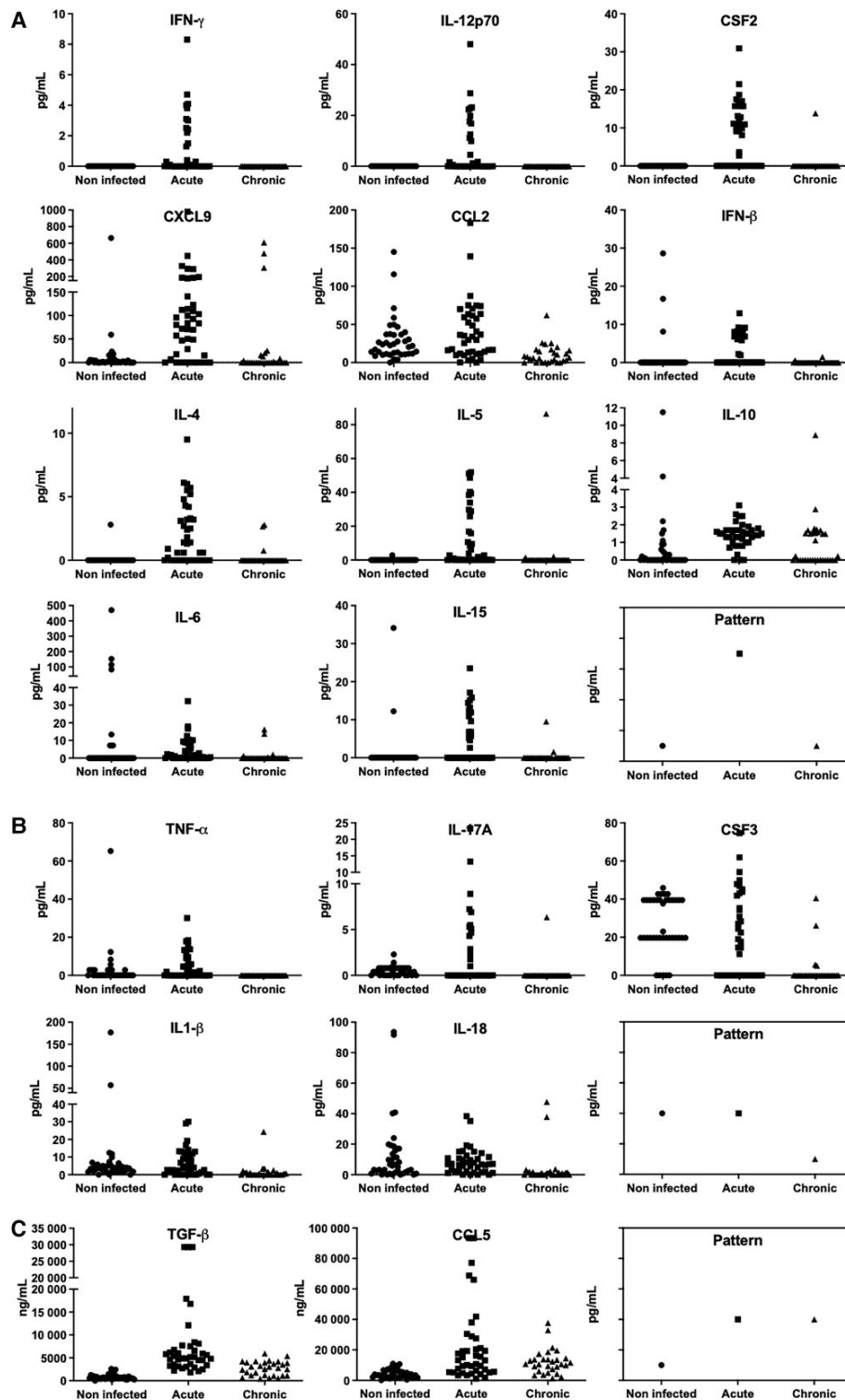


Figure 1. Serum cytokine concentration of the noninfected patients and patients with acute or chronic toxoplasmosis: (A) cytokines showing significant upregulation only in patients in the acute phase of infection; (B) cytokines with significant downregulation in patients in the chronic phase; and (C) cytokines with significantly elevated levels in patients from both the acute and chronic groups compared to the noninfected patients. Pattern plots show the relative dynamics between the 3 subgroups for each pattern. Abbreviations: CCL, CC chemokine ligand; CSF, colony-stimulating factor; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; IFN, interferon; IL, interleukin; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor.

Table 1. Median Cytokine Concentrations in the Noninfected, Acutely Infected, and Chronically Infected Pregnant Women, and Adjusted P Values for Each Pairwise Comparison

	Cytokine Concentration, Median (Range), pg/mL						Noninfected vs Acute	Noninfected vs Chronic	Acute vs Chronic
	Noninfected	Acute	Chronic	Noninfected vs Acute	Noninfected vs Chronic	Acute vs Chronic			
IFN-γ	0.0 (0-0)	0.0 (0-8.3)	0.0 (0-0)	<.0001 ****	>.9999 NS	<.0001 ****			
IL-12p70	0.0 (0-0)	0.0 (0-48)	0.0 (0-0)	<.0001 NS	>.9999 NS	<.0001 ****			
CSF2	0.0 (0-0)	8.6 (0-31)	0.0 (0-14)	<.0001 ****	>.9999 NS	<.0001 ****			
CXCL9	0.935 (0-664)	81.78 (0-980)	0.0 (0-610)	<.0001 ****	>.9999 NS	<.0001 ****			
CCL2	22.605 (0-145)	31.8 (0-183)	6.49 (0-62)	.9435 NS	.0007 ***	<.0001 ****			
IFN-β	0.0 (0-28.6)	0.0 (0-13)	0.0 (0-1.47)	.0004 ***	>.9999 NS	.0003 ***			
IL-4	0.0 (0-2.8)	1.095 (0-9.5)	0.0 (0-2.8)	<.0001 ****	>.9999 NS	<.0001 ****			
IL-5	0.0 (0-83)	1.34 (0-52)	0.0 (0-86)	<.0001 ****	>.9999 NS	<.0001 ****			
IL-10	0.0 (0-11.5)	1.505 (0-3.12)	0.0 (0-8.9)	<.0001 ****	.3228 NS	.0027 **			
IL-6	0.0 (0-472)	0.89 (0-32)	0.0 (0-16.2)	.0042 **	>.9999 NS	.001 ***			
IL-15	0.0 (0-34.1)	0.0 (0-23.5)	0.0 (0-9.5)	.0003 ***	>.9999 NS	.0012 **			
TNF-α	0.0 (0-65)	0.0 (0-30)	0.0 (0-0)	.0824 NS	.0551 NS	<.0001 ****			
IL-17A	0.0 (0-12)	0.0 (0-23)	0.0 (0-6.4)	.6155 NS	<.0001 ****	.005 **			
CSF3	19.74 (0-46)	14.56 (0-75)	0.0 (0-40)	.1177 NS	<.0001 ****	.0009 ***			
IL-1β	3.97 (0-177)	3.895 (0-30.1)	0.0 (0-24)	>.9999 NS	<.0001 ****	<.0001 ****			
IL-18	5.865 (0-93.5)	6.88 (0-38)	0.92 (0-48)	>.9999 NS	<.0001 ****	<.0001 ****			
TGF-β, ng/mL	675.1 (0-2607)	5.1644 (1.8-29.3)	2781.18 (465-5942)	<.0001 ****	.0001 ***	.0009 ***			
CCL5, ng/mL	3618.25 (132-10970)	13.22182 (1.1-93)	10 748.08 (1270-37 729)	<.0001 ****	<.0001 ****	>.9999 NS			
IL-1α	0.0 (0-0)	0.0 (0-4.2)	0.0 (0-52)	.1746 NS	.6157 NS	>.9999 NS			
CXCL8	29.995 (0-1332)	21.405 (0-1332)	18.94 (0-255)	>.9999 NS	>.9999 NS	>.9999 NS			
IL-17F	0.39 (0-2.2)	0.22 (0-2.3)	0.22 (0-1.6)	>.9999 NS	.5025 NS	.3322 NS			
IFN-α	0.0 (0-0.855)	0.0 (0-0.55)	0.0 (0-0.38)	>.9999 NS	>.9999 NS	>.9999 NS			
CXCL10	6.11 (2.5-171)	49.775 (2-205)	6.91 (0-95)	.1969 NS	>.9999 NS	.1112 NS			

n = 39, 40, and 29 sera for the noninfected, acute, and chronic groups, respectively. The comparisons between noninfected, acutely infected, and chronically infected groups were analyzed by Kruskal-Wallis test with Dunn correction for multiple comparisons. * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, **** P < .0001.

Abbreviation: CCL, CC chemokine ligand; CSF, colony-stimulating factor; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; IFN, interferon; IL, interleukin; NS, not significant; TGF, transforming growth factor.

second pattern (pattern B) comprised mostly inflammatory cytokines (IL-1β, CSF3, TNF-α, IL-18, and IL-17A) and was characterized by significantly lower levels in the chronic group as compared to both the noninfected and acute groups (Figure 1B). None of these immune mediators showed a statistically significant difference between the noninfected and acute groups. The third pattern (pattern C) comprised only TGF-β and CCL5 (RANTES), with their levels being significantly more elevated in the acute and chronic groups than in the noninfected group (Figure 1C). Finally, the remaining cytokines (CXCL8, IL-17F, CXCL10, IFN-α, and IL-1α), corresponding to pattern D, showed no differences between the groups or were expressed at very low levels throughout (Supplementary Figure 2A). Thus, whereas most cytokines were upregulated only during the acute infection phase with no difference between noninfected and chronically infected patients, some mediators, notably inflammatory cytokines, continued to be low and others, namely the anti-inflammatory TGF-β, continued to be high during chronic infection.

When looking more closely at the cytokine levels during acute infection, we regularly noticed a great variability of values, and often 2 or more distinct populations. Therefore, we dissected the

evolution of infection during this phase using IgG titers as a marker. The results are shown in Figure 2, with cytokines displayed in the same groups as in Figure 1. Obviously, for most of the immune mediators with lower concentrations in chronically infected than in acutely infected patients, we observed a significant negative correlation between IgG levels and cytokine concentrations, regardless of whether concentrations were higher in acute compared to noninfected patient groups (IFN-γ, IL-12p70, CSF2, IFN-β, IL-4, IL-5, IL-6, and IL-15; Figure 2A) or not (TNF-α, IL-17A, CSF3, and IL-1β; Figure 2B). For those cytokines that remained elevated in the chronic phase, no correlation with IgG levels was noted (Figure 2C). This lack of correlation was also observed for mediators whose levels did not differ between the 3 infection groups (Supplementary Figure 2B). Thus, most cytokines that were temporarily upregulated during acute infections showed their highest concentrations early in the infectious process, followed by a rapid decline to the levels observed in the chronic phase.

DISCUSSION

In studies characterizing the immune response in *T. gondii*-infected patients, parasite- or host-related factors will always

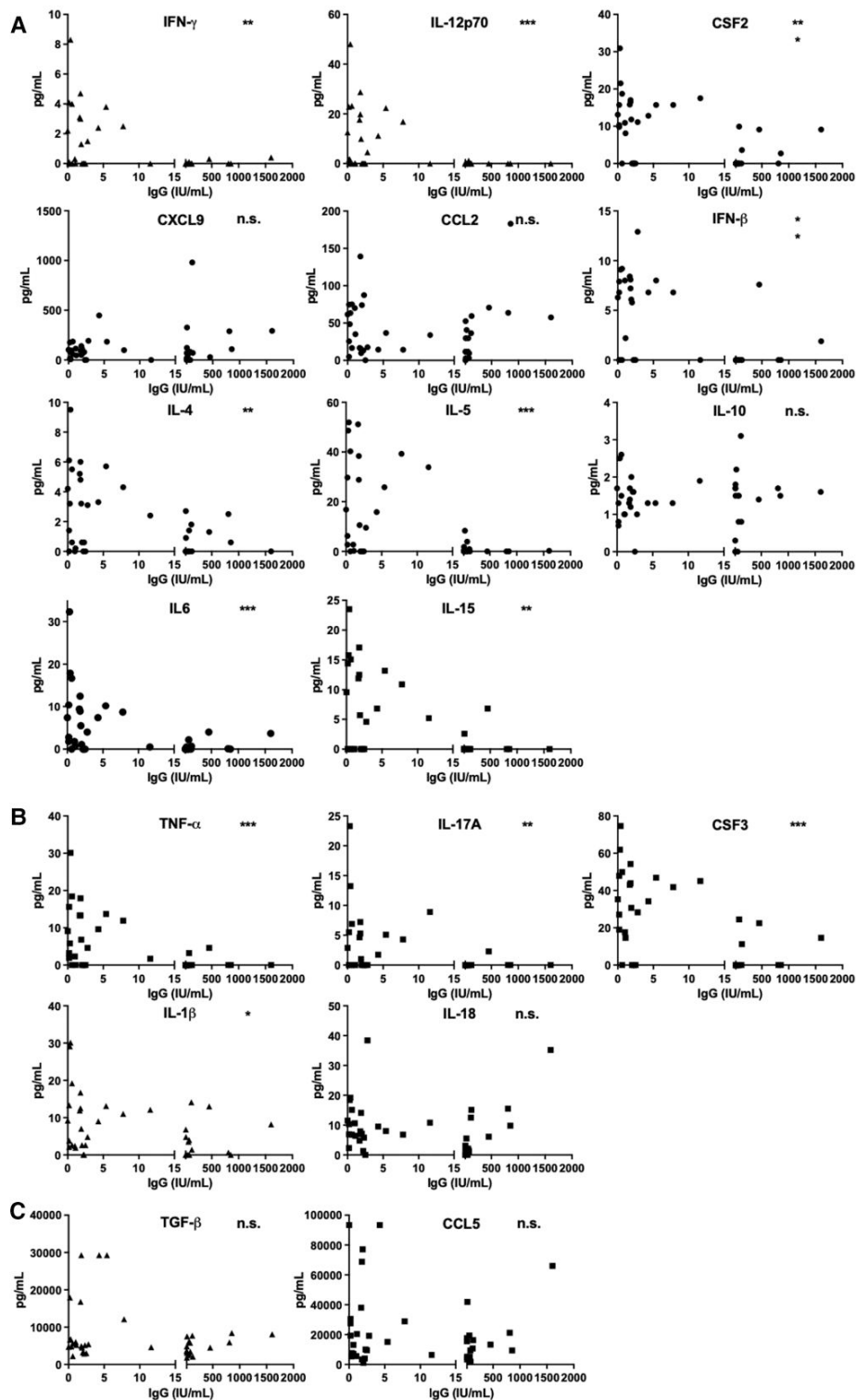


Figure 2. Correlation profiles between *Toxoplasma*-specific IgG and cytokine levels in patients with an acute toxoplasmosis. Cytokines are displayed as in Figure 1: (A) cytokines showing significant upregulation only in the acute phase of infection; (B) cytokines with significant downregulation in the chronic phase; and (C) cytokines with significantly elevated levels in both the acute and chronic groups compared to the noninfected group. Correlations were analyzed by Spearman correlation test. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$. Abbreviations: CCL, CC chemokine ligand; CSF, colony-stimulating factor; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; IFN, interferon; IgG, immunoglobulin G; IL, interleukin; ns, not significant; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor.

exert an influence. This was evident in the different studies looking at peripheral cytokine response in acutely or chronically infected populations. Most of them were performed in South America, where high infection rates and virulent parasite strains facilitate the enrollment of sufficient numbers of patients. However, the highly variable strains in this region make it more difficult to draw conclusions regarding the patients' response. The particular character of the South American setting has been demonstrated repeatedly by comparison with European or North American patients [3,4]. The latter study [3], comparing US and Colombian pregnant women, showed a relatively small impact of infection on serum cytokine levels in Colombia. Similar observations were made when exploring cytokine aqueous humor levels, as evidenced by one of our previous studies and by others in South America [18,20–22]. Interestingly, US patients, however, showed diminished levels of a substantial number of immune mediators, which we did not observe for any mediator in our French patients. However, heterogeneity of parasite strains cannot be excluded in this US setting, where approximately 50% of infections were due to non-type II strains [8]. In French, and other European populations, as in our study, there was nearly homogenous type II infection, even if a few non-type II infections may have been included [23,24]. Furthermore, the routine French surveillance protocol for *T. gondii* infections in pregnant women enabled us to recruit patients in different infection phases, with minimal interference of concomitant infections. Avidity measurement allowed us to delimit more precisely the time frame of the acute phase to about 3 to 4 months following infection according to the manufacturer's instructions for the different detection kits, in contrast to IgM expression only, where the time frame can reach 1 year and may thus misinterpret early chronic infection as acute infection. It is also noteworthy that some of the cytokines that were poorly or not expressed in our noninfected group showed substantial serum concentrations in the American noninfected cohort [3]. This disparity, perhaps due to patient recruitment bias, could explain some of the differences compared to our observations.

While focusing specifically on the different cytokines during the distinct phases of infection, we could identify different patterns of reactivity. Pattern A, with elevated serum concentrations only during the acute phase, comprises classical Th1 cytokines, such as IFN- γ , IL-12, CXCL9 (MIG), and CCL2 (MCP1). CXCL9 was also reported to be elevated in infected Brazilian patients, both adults [17,25] and newborns [16]. Interestingly, there also seemed to be a counterbalancing Th2 response during acute infection, as evidenced by elevated IL-4 and IL-5 levels, with similar observations also made in some mouse studies [26,27]. In contrast, our observation of increased IFN- β levels during this phase has not been reported in the aforementioned studies. This type I IFN has very well-described

antiviral properties; however, its role in *Toxoplasma* infection is still controversial [28,29]. Our results indicate its involvement in the acute infection phase. Pattern B is characterized by significantly lower serum levels during the chronic phase, as compared to both the noninfected and acute groups. In contrast, the levels did not significantly differ between the acute phase and noninfected groups. Interestingly, we identified several inflammatory mediators, such as TNF- α , IL-17A, and CSF3, in this group. The pattern C mediators, whose serum levels remained elevated during the chronic phase, contained the anti-inflammatory cytokine TGF- β . These findings demonstrate that this long-lasting chronic infection creates a new immunological equilibrium towards an anti-inflammatory response. This changing equilibrium seems to be strain dependent. A Brazilian study of pregnant women actually also found lower TNF- α concentrations in chronically infected patients, but, in contrast to our results, a strong depression of IFN- γ production [3]. Additionally, TGF- β levels were only enhanced during acute infection, but not during the chronic phase [17]. The observed suppression of potentially harmful inflammatory responses is evidently protective, but could render an infected person more vulnerable to certain infections and other challenges, and it would therefore be interesting to compare *T. gondii* with other infections. Previous results have also established a link between certain clinical contexts and failure to reach such equilibrium. For example, an increased expression of the IL-6 and IL-1 β genes was observed in pregnant women infected with *T. gondii* who have had a miscarriage [30]. During ocular toxoplasmosis, ocular cytokine profiles were characterized by increased levels of IL-17, IL-33, IL-10, CXCL9, and CXCL10 [16,22,31,32], and decreased levels of CCL11, CCL26, MIF, and CXCL12 [16]. Moreover, lower levels of CCL2 were associated with active ocular toxoplasmosis lesions, but more data are needed to define the subtle links between peripheral cytokine levels and localized disease, especially as these markers could differ between the local, ocular compartment, and peripheral circulation. A study on acute ocular toxoplasmosis reported enhanced TGF- β expression in peripheral blood mononuclear cells, while the corresponding aqueous humor levels were diminished [22]. The dynamics between local and circulating immune cells could explain the distinct local manifestations of *Toxoplasma* infection.

Our results demonstrated that the acute phase was the most dynamic part of the immune reaction during *T. gondii* infection. While this has been shown previously, no study specifically looked at the dynamics within this phase. Indeed, we observed a great variability of values, or sometimes 2 or more distinct populations, during this phase, whereas this was very rarely the case in noninfected and chronically infected patients. This led us to conclude that the heterogeneous cytokine levels were due to clear-cut dynamics within the acute phase. These were especially evident in pattern A, where the markedly

increased cytokine levels were clearly confined to the early phase of acute infection. Even if we cannot determine the exact timing corresponding to these IgG titers, the initially increased cytokine levels in this pattern seem to drop at an early time point. This result could be important to interpret the acute phase in future studies, as well as to determine the infection status of individual patients in difficult diagnostic situations, like persistent IgM production or acute infection without IgM antibodies.

In conclusion, we characterized the serum cytokine levels in a European setting with predominantly type II strains and observed substantial secretion of Th1 and Th2 cytokines during acute infection, as well as an anti-inflammatory bias during chronic infection. Additionally, our results found that most cytokine activation occurred in the initial phase of the acute infection. These results could pave the way to better understand the immune dynamics of *T. gondii* infection, especially when including subsequent localized pathologies such as ocular toxoplasmosis in further studies, and thus help to guide diagnosis and treatment.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copy-edited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Financial support. No financial support was received for this work.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Hide G. Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2016**; 14:335–44.
2. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* **2002**; 8: 634–40.
3. Pernas L, Ramirez R, Holmes TH, Montoya JG, Boothroyd JC. Immune profiling of pregnant toxoplasma-infected US and Colombia patients reveals surprising impacts of infection on peripheral blood cytokines. *J Infect Dis* **2014**; 210: 923–31.
4. de-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, et al. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased IFN- γ /IL-17a and increased IL-6/IL-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**; 7:e2541.
5. Petersen E, Edvinsson B, Lundgren B, Benfield T, Evengård B. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2006**; 25:401–4.
6. Vidal JE. HIV-related cerebral toxoplasmosis revisited: current concepts and controversies of an old disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care* **2019**; 18:2325958219867315.
7. Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. *Clin Experiment Ophthalmol* **2013**; 41:95–108.
8. Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* **2014**; 141:453–61.
9. Khan A, Jordan C, Muccioli C, et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* **2006**; 12:942–49.
10. Abdollahi SH, Ayoobi F, Khorramdelazad H, et al. Interleukin-10 serum levels after vaccination with in vivo prepared *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Oman Med J* **2013**; 28:112–5.
11. Saeij JP, Frickel EM. Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole: a role for GBPs, autophagy and host cell death. *Curr Opin Microbiol* **2017**; 40:72–80.
12. Fisch D, Clough B, Frickel EM. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **2019**; 15:e1008097.
13. Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, et al. NK cell-derived interferon- γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* **2012**; 36:1047–59.
14. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **1994**; 153:2533–43.
15. de Araújo TE, Coelho-Dos-Reis JG, Béla SR, et al. Early serum biomarker networks in infants with distinct retino-choroidal lesion status of congenital toxoplasmosis. *Cytokine* **2017**; 95:102–12.
16. Marino AP, Dos Santos LI, Henriques PM, et al. Circulating inflammatory mediators as biomarkers of ocular toxoplasmosis in acute and in chronic infection. *J Leukoc Biol* **2020**; 108:1253–64.
17. Marchioro AA, Colli CM, de Souza CZ, et al. Analysis of cytokines IFN- γ , TNF- α , TGF- β and nitric oxide in amniotic fluid and serum of pregnant women with toxoplasmosis in southern Brazil. *Cytokine* **2018**; 106:35–9.
18. Mantilla-Muriel LE, Hernández-de-Los-Ríos A, Rincón M, et al. Serotyping, host genes and cytokines response in human ocular toxoplasmosis. *Microb Pathog* **2020**; 148: 104465.

19. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: recommendations from the French national reference center for toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2016**; 84:22–33.
20. Smith JR, Ashander LM, Arruda SL, et al. Pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Prog Retin Eye Res* **2021**; 81:100882.
21. de-la-Torre A, Pfaff AW, Grigg ME, Villard O, Candolfi E, Gomez-Marin JE. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine* **2014**; 68:23–31.
22. Raouf-Rahmati A, Ansar AR, Rezaee SA, et al. Local and systemic gene expression levels of IL-10, IL-17 and TGF- β in active ocular toxoplasmosis in humans. *Cytokine* **2021**; 146:155643.
23. Ajzenberg D, Collinet F, Aubert D, et al. The rural-urban effect on spatial genetic structure of type II *Toxoplasma gondii* strains involved in human congenital toxoplasmosis, France, 2002–2009. *Infect Genet Evol* **2015**; 36:511–6.
24. Morisset S, Peyron F, Lobry JR, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect* **2008**; 10:742–7.
25. de Araújo TE, Dos Santos LI, Gomes AO, et al. Putative biomarkers for early diagnosis and prognosis of congenital ocular toxoplasmosis. *Sci Rep* **2020**; 10:16757.
26. Calabrese KS, Tedesco RC, Zaverucha do Valle T, Barbosa HS. Serum and aqueous humour cytokine response and histopathological alterations during ocular *Toxoplasma gondii* infection in C57BL/6 mice. *Micron* **2008**; 39: 1335–41.
27. Mammari N, Vignoles P, Halabi MA, Dardé M-L, Courtioux B. Interferon gamma effect on immune mediator production in human nerve cells infected by two strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasite* **2015**; 22:39.
28. Mahmoud ME, Ui F, Salman D, Nishimura M, Nishikawa Y. Mechanisms of interferon-beta-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* growth in murine macrophages and embryonic fibroblasts: role of immunity-related GTPase M1. *Cell Microbiol* **2015**; 17:1069–83.
29. Matta SK, Olias P, Huang Z, et al. *Toxoplasma gondii* effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**; 116:17480–91.
30. Mousa NM, Jasim HM. Gene expression of two innate cytokines in a miscarriage toxoplasmosis woman. *Ann Parasitol* **2021**; 67:281–6.
31. Zhang Y, He J, Zheng H, Huang S, Lu F. Association of TREM-1, IL-1 β , IL-33/ST2, and TLR expressions with the pathogenesis of ocular toxoplasmosis in mouse models on different genetic backgrounds. *Front Microbiol* **2019**; 10:2264.
32. Thieme C, Schlickeiser S, Metzner S, Dames C, Pleyer U. Immune mediator profile in aqueous humor differs in patients with primary acquired ocular toxoplasmosis and recurrent acute ocular toxoplasmosis. *Mediators Inflamm* **2019**; 2019:9356728.

III. Discussion/Conclusion

Cette étude est la première qui décrit le cytokinome d'une infection toxoplasmique au sein d'une population homogène de femmes enceintes européennes, majoritairement infectées par des souches de type II. Elle a permis d'identifier 2 groupes de cytokines dont les profils varient en fonction du stade de l'infection et de confirmer l'implication des voies Th1 et Th2 dans la réponse immunitaire lors d'une toxoplasmose chez la femme enceinte. Elle a également montré une corrélation entre les taux de cytokines et les titres d'IgG au cours d'une infection aiguë, laissant présager l'existence de profils cytokiniques qui varieraient en fonction du stade de l'infection.

Les profils observés ici diffèrent de ceux déjà décrits dans les populations de femmes enceintes d'Amérique du sud et des Etats-Unis. Pour exemple, dans notre étude, le GM-CFS (CSF2), l'IFN- γ ou encore l'IL-10 sont augmentées uniquement en phase aiguë alors que chez les patientes nord et sud-américaines, ces cytokines sont augmentées indépendamment du stade de l'infection ou diminuées vs les patientes non infectées¹¹⁶. De même, les profils décrits ici diffèrent de ceux décrits pour d'autres types de populations. Ces différences démontrent bien la nécessité d'adapter les études de profils cytokiniques à des populations bien définies.

Malgré les variations observées, notre étude n'a pas mis en évidence une cytokine particulière qui permettrait de distinguer les infections aiguës des infections chroniques avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Il aurait été intéressant d'analyser des combinaisons de cytokines pour déterminer leur capacité à discriminer les stades de l'infection mais les effectifs de cette étude sont trop faibles pour réaliser ce type d'analyse avec une fiabilité statistique suffisante. Néanmoins, ces résultats confirment l'intérêt de certaines cytokines et ouvrent la voie à leur utilisation comme biomarqueurs possibles des différents stades de l'infection et comme aide à la datation de l'infection, en complément de l'avidité chez la femme enceinte. Nous poursuivons actuellement ce

travail sur des cohortes plus importantes et dans des situations cliniques bien ciblées avec pour objectif de déterminer des combinaisons de cytokines qui permettraient de différencier :

- Une infection aiguë et une infection chronique avec des IgM résiduelles.
- Une avidité basse/intermédiaire associée à une infection aiguë ou à une infection chronique.
- Des faux positifs IgM.

Par la suite, il serait également possible d'envisager l'utilisation de marqueurs cytokiniques chez les patients immunodéprimés pour le diagnostic biologique des réactivations, ou des récurrences de toxoplasmose oculaire. Toutefois, ce type d'étude sera plus compliqué à mener. En effet, il existe une grande variété de facteurs d'immunodépression et de co-morbidités et chacun de ces terrains peut donner lieu à un profil de cytokine particulier. Ainsi, la détermination de biomarqueurs cytokiniques dans ces populations nécessitera de multiplier les profils et le nombre de patients inclus ce qui implique de réaliser des études multicentriques.

Enfin, de précédents travaux ont montré des profils cytokiniques variables selon la zone géographique (Amérique du Sud vs Amérique du Nord vs Europe) et donc possiblement selon le type de souche infectante¹¹⁶. Il serait ainsi intéressant d'aller explorer les profils cytokiniques en fonction des types de souches présents chez les patients.

DEUXIEME PARTIE
Identification de marqueurs de sérotypage

I. Contexte

L'importance de la toxoplasmose en termes de santé publique varie grandement d'une zone géographique à l'autre. Certaines régions recensent un nombre plus élevé de toxoplasmose avec des formes cliniques graves plus nombreuses, parfois même chez des patients immunocompétents. Dans ces régions, les conditions climatiques et socio-économiques favorisent l'exposition des populations au parasite et l'accès aux soins peut s'avérer limité⁴⁹. Mais ces facteurs n'expliquent pas, à eux seuls, la sévérité clinique observée. L'étude du génome de *T. gondii* a révélé une diversité génétique des souches bien plus importante que celle qui aurait été attendue au sein d'une seule espèce, notamment dans les régions où les manifestations cliniques sont les plus sévères, suggérant un lien entre le génotype et la virulence clinique^{49,164}. Ce lien a été observé dans de nombreuses études, démontrant l'importance et l'intérêt de génotyper les souches de patients^{83-86,90,92,97}.

A ce jour, le typage des souches d'origine humaine est limité puisque les techniques utilisées nécessitent une quantité suffisante d'ADN ce qui s'observe en général chez des patients présentant des manifestations cliniques sévères, le plus souvent des patients très immunodéprimés ou des patients présentant des formes graves. Cette limitation technique restreint considérablement notre connaissance de l'épidémiologie réelle des souches ainsi que la prise en charge des patients. Pour contourner ces difficultés, il serait intéressant de développer une technique indirecte de typage telle que le sérotypage, qui aurait toute sa place dans l'arsenal diagnostique de la toxoplasmose.

Le sérotypage vise à identifier des profils sérologiques spécifiques de génotypes. Plusieurs tests existent déjà^{36,165,165-172}. Ils consistent à détecter des anticorps spécifiques de génotypes à l'aide de peptides de *T. gondii*, aux-mêmes spécifiques de génotype et ce, par des techniques ELISA. Quelques peptides spécifiques de type ont ainsi été décrits. Tous ont été obtenus à partir d'études réalisées strictement *in silico* : de l'identification de protéines immunogènes à la détermination des séquences peptidiques présentant un polymorphisme de type. Les protéines les plus étudiées pour le

développement de ces tests sont celles issues d'organelles propres aux apicomplexes comme les protéines MICs, RON/ROPs, GRAs et SAGs¹⁶⁵⁻¹⁷³.

Les tests déjà développés sont peu utilisés du fait d'un manque de spécificité¹⁷⁴. En effet, la plupart d'entre eux sont capables de distinguer le type II des non-II mais peinent à discriminer les autres types. En outre, l'évaluation de leurs performances réelles chez les patients est délicate compte-tenu de la difficulté à obtenir des sérums génotypés. L'une de ces techniques de sérotypage a notamment été évaluée sur le site des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg¹⁶⁵. Sur les 19 sérums humains génotypés testés, le taux de concordance sérotypage/génotypage était seulement de 37 % (Annexe 2).

La plupart de ces tests sont élaborés de manière à ce qu'un seul peptide puisse identifier un seul type de souche. Or, dans le cadre du génotypage, c'est l'analyse de la combinaison de plusieurs marqueurs qui permet de typer les souches⁴⁹. Ainsi, un test multiplexe utilisant la combinaison de plusieurs peptides représentatifs d'un type pourrait être plus performant que les tests utilisant un seul peptide pour représenter un type. De plus, les études précédentes ont analysé le polymorphisme d'un nombre très restreint de protéines, environ 70 au total, en se concentrant préférentiellement sur des protéines apicomplexes. Ce choix est judicieux puisque plusieurs travaux ont démontré que les effets de ces protéines semblent dépendre du type de la souche (cf §Introduction : ROP18, ROP5, GRA6 ...). Cependant, des protéines autres que celles provenant du complexe apical interagissent avec l'hôte et pourraient engendrer une réponse immunitaire spécifique de type. L'étude des protéines apicomplexes seules limite donc la découverte de marqueurs potentiels pour le développement d'un test de sérotypage. Le développement de nouveaux tests pourrait ainsi passer par l'étude d'un panel plus large de protéines et par la combinaison de marqueurs pour l'identification indirecte des types. En conséquence, afin de pallier au manque de spécificité des peptides déjà décrits, il paraît indispensable d'identifier de nouveaux

peptides spécifiques de type. Pour cela, une approche expérimentale non ciblée à partir d'un modèle d'infection *in vivo*, en amont des analyses bioinformatiques, nous paraît pertinente.

L'objectif de ce travail consiste donc à utiliser un modèle d'infection murin *in vivo* couplé à une approche non ciblée pour identifier de nouvelles protéines antigéniques et développer un test de sérotypage. Pour ce faire, nous avons adopté deux stratégies. La première consiste à réaliser un test « multiplexe » de type western blot (WB) pour mettre en évidence des profils de bandes spécifiques de génotypes. La deuxième consiste à identifier les protéines immunogènes de *T. gondii* par des réactions de co-immunoprécipitation (co-IP) révélées par spectrométrie de masse, et d'en étudier *in silico* le polymorphisme afin d'identifier des candidats permettant la mise au point d'un test ELISA de sérotypage.

II. Stratégie n° 1

1. Contexte

La stratégie n°1 consiste à analyser des profils de WB pour mettre en évidence des bandes types spécifiques. Pour cela, des migrations de lysats de tachyzoïtes de différents génotypes sont révélées par des sérums provenant d'individus infectés. Ici, la recherche de spécificité ne se restreint plus à l'étude ciblée de quelques protéines et permet d'appréhender la réponse « anti-génotype » dans sa globalité et sans *a priori*. De plus, ce type de technique est tout à fait susceptible d'être inclus dans une activité de routine de laboratoire de diagnostic.

Une étude préliminaire d'exploration des profils des WB a été menée à partir de sérums murins hyperimmuns et de sérums humains typés et non typés. Ce travail a été réalisé à l'aide 3 souches de *T. gondii* : FOU (type Africa 1), ME49 (type II) et VEG (type III). Les WB ont été réalisés en faisant migrer des lysats de tachyzoïtes de ces 3 souches et ont été révélés avec des sérums de souris non infectées ou hyperimmunisées vis-à-vis de ces mêmes souches ainsi qu'avec des sérums de patients témoins non infectés et de patient infectés par *T. gondii*.

2. Matériel et méthode

a. Souches

Les souches FOU (TgH00007, Africa 1), Me49 (TgA00001, type II) et VEG (TgH00005, type III) ont été obtenues *via* le CRB *Toxoplasma* (<http://www.toxocrb.com>). Elles ont été cultivées sous forme tachyzoïtes *in vitro* sur cellules VERO (ATCC CCL-81) selon les recommandations du CRB *Toxoplasma*.

b. Sérums murins hyper-immuns

Des souris Swiss-Webster femelles âgées de 6 à 10 semaines (RjORL:Swiss) (Janvier) ont été infectées par des injections intrapéritonéales de tachyzoïtes, issus de la culture *in vitro*. Les doses infectieuses étaient de 5.10^4 tachyzoïtes pour FOU et 2.10^4 tachyzoïtes pour Me49 et VEG. Les souris sont traitées par de la sulfadiazine (60 mg/kg/j) dès J1 post-infection. Une ré-infection a lieu 4 semaines après la primo-infection. Les sérums de souris sont prélevés 10 semaines après la primo-infection. Des sérums témoins de souris non infectées ont également été prélevés.

c. Sérums humains

Des sérums provenant de patient suivis aux Hôpitaux Universitaire de Strasbourg ont été testés. , Le dépistage sérologique de la toxoplasmose (dosages des IgM, des IgG +/- de l'avidité des IgG) a été réalisés avec les réactifs Toxo IgM, Toxo IgG et Toxo IgG Avidity ARCHITECT® (Abott) selon les recommandations du fabricant. Douze sérums de 12 patients ont été testés (tableau 4) : 8 présentent une toxoplasmose dont la souche a pu être typée pour 4 d'entre eux (1 Africa 1, 1 Africa 2 et 2 de type II) et 4 sont des témoins non infectés.

Partie 2 : identification de marqueurs de sérotypage-Stratégie 1

N°	Terrain	Groupe	Type	IgM (UI/mL)	IgG (UI/mL)	Avidité
1	Greffe	Réactivation	Af 1	0.09 : Négatif	76.4 : Positif	Non réalisée
2	VIH	Réactivation	Af 2	0.25 : Négatif	1346 : Positif	Non réalisée
3	Auto-immunité	Primo-infection	II	36.07 : Positif	98.4 : Positif	10.7 % : Basse
4	Femme enceinte	TC	II	0.65 : Positif	128 : Positif	Non réalisée
5	Femme enceinte	Toxoplasmose chronique	II*	0.1 : Négatif	13.8 : Positif	Non réalisée
6	Femme enceinte	Toxoplasmose chronique	II*	1.61 : Positif	27.9 : Positif	72,8 % : Elevée
7	Femme enceinte	Toxoplasmose chronique	II*	0.82 : Positif	335.6 : Positif	86,8 % : Elevée
8	Femme enceinte	Toxoplasmose chronique	II*	0.06 : Négatif	8.6 : Positif	85,3 % : Elevée
9	Femme enceinte	Non infecté	NA	0.12 : Négatif	0,1 : Négatif	Non réalisée
10	Femme enceinte	Non infecté	NA	0.12 : Négatif	0,1 : Négatif	Non réalisée
11	Femme enceinte	Non infecté	NA	0.04 : Négatif	0,0 : Négatif	Non réalisée
12	Femme enceinte	Non infecté	NA	0.05 : Négatif	0,1 : Négatif	Non réalisée

Tableau 4 : Paramètres sérologiques et situation clinique des patients testés en western blot.

Af :Africa. II* : type II présumé. TC : toxoplasmose congénitale. NA : Non Applicable.

d. Lysats de tachyzoïtes

Des tachyzoïtes (10^8 /mL) issus de la culture *in vitro* sont récupérés puis lysés avec le tampon du kit Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP (Thermo Scientific). Brièvement, les surnageants de culture des flasques sont récupérés et centrifugés 5 min à 3000 rpm. Le culot est remis en suspension dans 1 mL

de PBS à 0,1 M. La suspension est à nouveau centrifugée 5 min à 3000 rpm et le culot est repris dans 10 mL de PBS à 0,1 M. Une numération des tachyzoïtes vivants est réalisée au microscope à contraste de phase. Une suspension de 10^8 tachyzoïtes dans 1 mL de tampon de lyse est préparée. La suspension est mise sur glace et vortexée toutes les 5 min pendant 30 minutes puis elle est centrifugée 10 min à 3000 rpm. La concentration protéique du surnageant est déterminée par la méthode de Bradford puis les échantillons sont aliquotés et conservés à -80°C

e. Western blot

Des gels d'acrylamide de gradient 4-12 % (kit Novex WedgeWell tris glycine, Fisher scientific) ont été utilisés pour optimiser la séparation des protéines de tachyzoïtes. Une solution de 5 μg de protéines dans 20 μL de bleu de charge 8x est déposée dans les puits après une incubation de 5 min à 100°C . La migration est réalisée à 150V pendant 1h dans un tampon 10X TRIS/glycine/SDS (BioRad). Le transfert est réalisé sur une membrane de PVDF pendant 55 min à 250 mA dans un tampon 10X TRIS/glycine (BioRad). La membrane est incubée overnight sous agitation à $+4^{\circ}\text{C}$ dans du BSA 10%, lavée 2x dans du PBS 10 %, incubée 2h sous agitation avec le sérum des patients dilués dans du BSA 0,1 %, lavées 2x au PBS 10 %, incubée 1h sous agitation avec l'Ac II^R Anti human IgG au 1/5000 (Invitrogen). La révélation se fait à l'aide du kit Clarity Western ECL substrat (BioRad).

3. Résultats

a. Chez la souris

Une première phase de mise au point des conditions de migration, de transfert et de révélation avec les sérums de souris a été réalisée avec les 3 souches. Plusieurs conditions ont été testées : 3 concentrations d'acrylamide (12 %, gradient 10-20 % et 4-12 %) ; 3 dilutions de sérums (1/10 et 1/50) et 3 dilutions d'Ac II^R (1/2 500, 1/5 000 et 1/10 000). A l'issue de ces tests, les conditions de gel en gradient d'acrylamide 4-12 %, la dilution 1/50 de sérum et la dilution 1/10 000 d'AcII^R ont été

retenues (données non montrées). Les WB réalisés montrent une absence de bandes pour le sérum négatif et la présence de nombreuses bandes pour les sérums de souris infectées par FOU, ME49 et VEG quelle que soit la piste analysée (Figure 11).

Les profils sont pour la plupart conservés entre les différents sérums. On peut noter des variations d'intensité des bandes, par exemple pour le WB sérum ME49-tachyFOU¹ ou encore pour sérum VEG-tachyVEG (Figure 11, flèches bleues). Ces différences d'intensités semblent reproductibles d'une expérimentation à l'autre (données non montrées). Trois bandes semblent uniques : 2 bandes à environ 75 kDa sur le WB sérum FOU-tachyFOU et sur le sérum FOU-tachyME49 et 1 bande à environ 60 kDa sur le WB sérum FOU-tachyVEG (Figure 11, flèches rouges). Compte-tenu de la faible intensité de ces bandes, il est difficile de conclure sur leur spécificité.

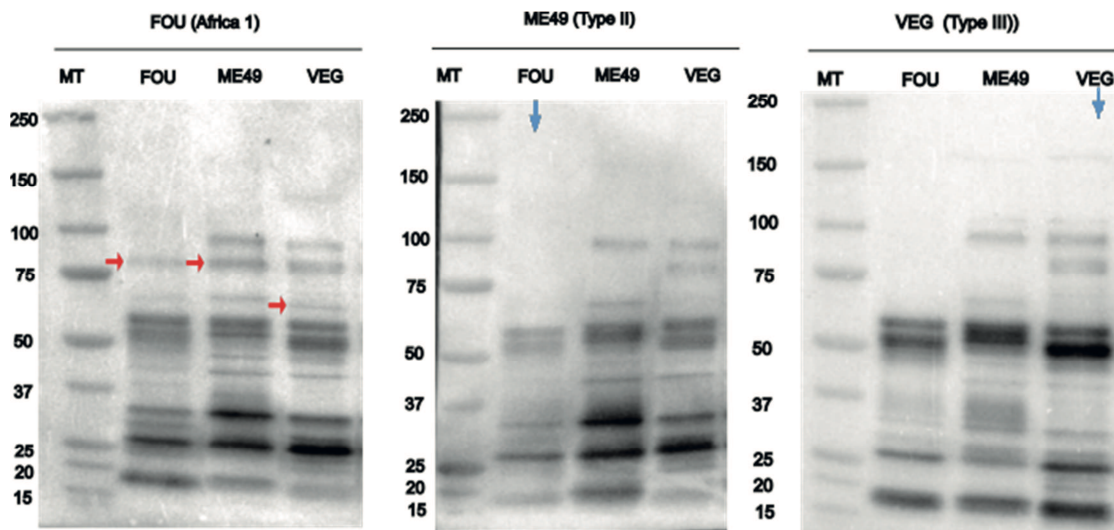


Figure 11 : Western Blot murins.

La migration est réalisée avec des lysats de tachyzoïtes de FOU, ME49 et VEG. La révélation est réalisée avec un sérum murin négatif, un sérum de souris hyperimmunisée avec FOU, avec ME49 et avec VEG. MT : Marqueur de taille. Flèches bleues et rouges : profils et bandes remarquables.

¹ tachyFOU : tachyzoïte de la souche FOU

b. Chez l'Homme

Pour les sérums humains, on peut faire les mêmes observations que pour les sérums murins (Figure 12) : les différences entre les profils portent essentiellement sur l'intensité des bandes.

Pour les sérums typés, les bandes observées entre 75 et 15 kDa semblent plus intenses pour les sérums 1 et 2 (type Africa 1 et 2) que pour les sérums 3 et 4 (type II). L'intensité des bandes semble indépendante du titre d'IgM/G : le sérum 4 (type II) présente des intensités de bandes plus faibles que le sérum 1 (Africa 1) mais ses taux d'IgM/G sont plus élevés. Lorsqu'on compare les sérums de type Africa (sérums 1 et 2), on observe des profils similaires. Les profils des 2 sérums de type II (sérums 3 et 4) sont également très proches.

Pour les patientes enceintes avec une toxoplasmose chronique, présumée de type II (sur critère épidémiologique), on observe le même type de résultat (Figure 12) avec des variations qui portent majoritairement sur l'intensité des bandes. Lorsqu'on compare les profils de type II présumés et avérés, on observe des bandes d'intensité plus élevée pour les types II présumés mais des profils identiques.

La seule bande remarquable entre les 8 sérums humain est celle présente à environ 125 kDa sur le WB sérum 3-tachyVEG (Figure 12, flèche rouge).

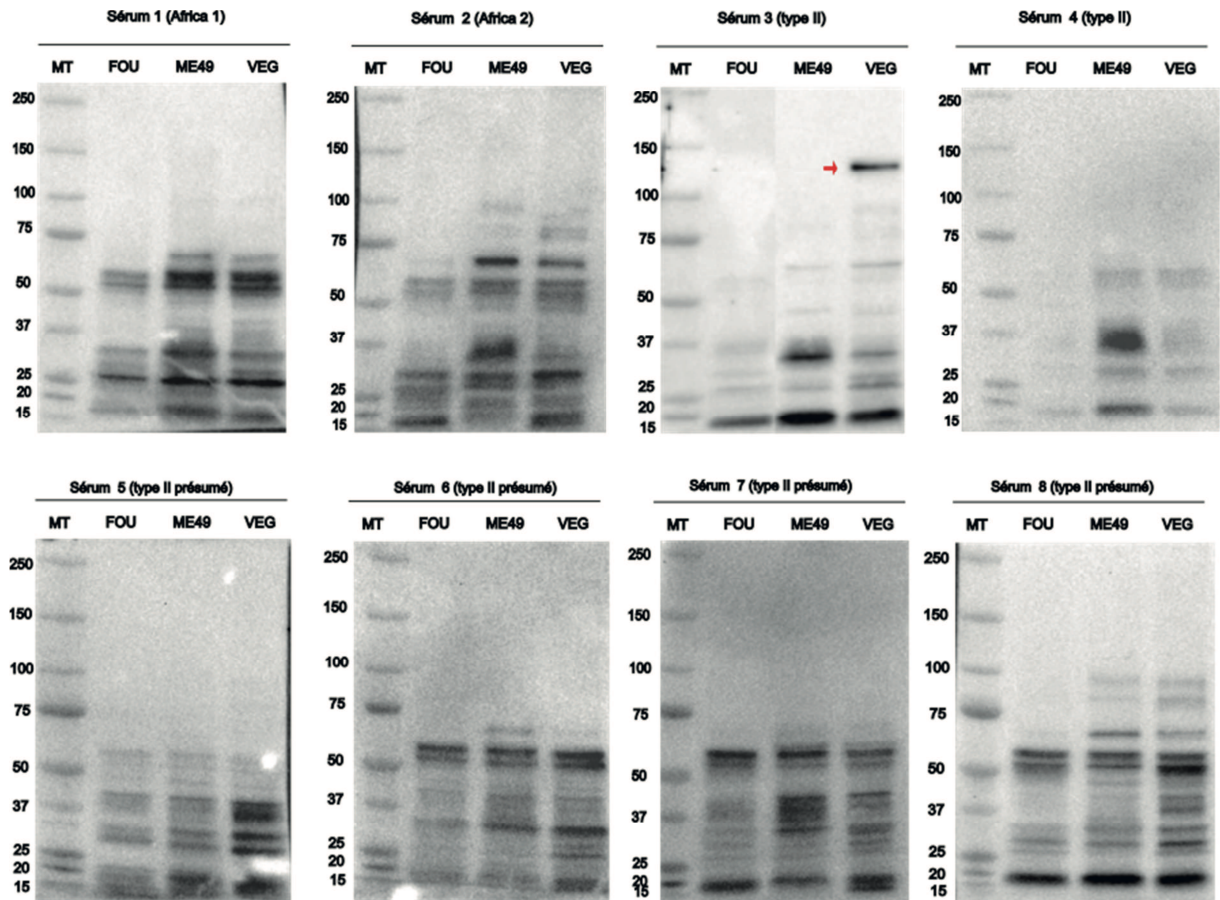


Figure 12 : Western Blot de sérums humains type avéré et type présumé.

La migration est réalisée avec des lysats de tachyzoïtes de FOU, ME49 et VEG. La révélation est réalisée avec des sérums humains : Africa 1 (sérum 1), Africa 2 (sérum 2), type II (sérums 3 et 4), type II présumé (sur des critères épidémiologiques, sérums 5 à 8).
 MT : Marqueur de taille. Flèche rouge : bande remarquable.

En parallèle des sérums typés, des sérums témoins de patientes non infectées ont été testés (Figure 13). Pour le sérum 9, aucune bande n'est observée. En revanche, les révélations par les sérums 10 à 12 ont mis en évidence la présence de bandes aspécifiques, particulièrement avec les tachyzoïtes de ME49 et VEG. On peut observer par exemple des bandes à 70 et 20 kDa sur le WB du sérum 10, des bandes entre 75 et 25 kDa sur le WB sérum11-tME49 et sur le WB sérum11-tVEG (Figure 13, flèches rouges). Les bandes observées sont d'intensité faibles mais comparables aux intensités de certaines des bandes observées avec les sérums de patients infectés. De plus, les profils sont variables d'une patiente à l'autre.

Pour vérifier si ces bandes sont dues à un bruit de fond par fixation sur la membrane ou à une fixation aspécifique sur les protéines de tachyzoïtes, nous avons effectué la révélation d'une piste contenant uniquement du PBS et du bleu de charge. Aucun signal n'a été observé, ce qui suggère une fixation aspécifique sur les protéines du toxoplasme. Enfin, un test sur 2 sérums négatifs décomplémentés a été réalisé et n'a pas permis la disparition des bandes aspécifiques (données non montrées).

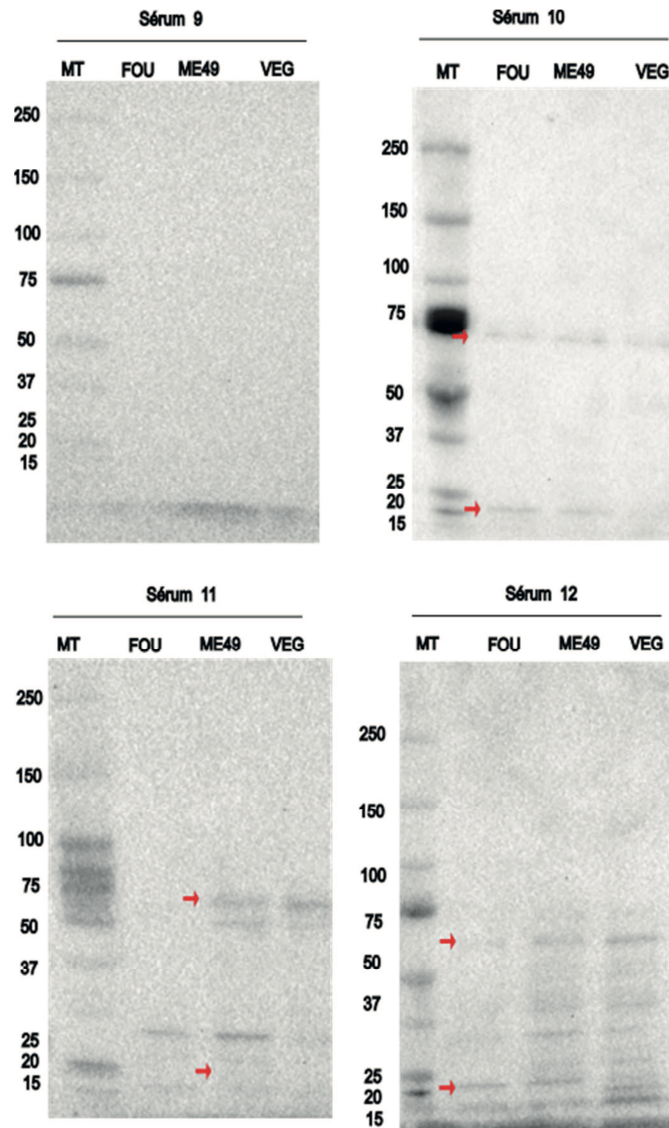


Figure 13 : Western Blot humains de sérums témoins (patientes enceintes non infectées).
La migration est réalisée avec des lysats de tachyzoïtes de FOU, ME49 et VEG. La révélation est réalisée avec des sérums humains de patients non infectés. MT : Marqueur de taille. Flèche rouge : bande remarquable.

4. Discussion/conclusion

La révélation des WB par des sérums murins et humains infectés montre différents profils avec l'apparition ou l'intensification de certaines bandes selon les pistes et le type de la souche infectante. Le plus souvent, les différences portent sur les intensités de bandes. Bien que celles-ci semblent reproductibles d'une expérimentation à l'autre, il est difficile de les interpréter en absence d'un témoin quantitatif fiable. Quelques bandes semblent présentes uniquement sur certains profils murins et sur certains profils humains. Toutefois, elles ne sont pas identiques entre les sérums murins et humains qui correspondent à une infection par le même type de souche. De même, la bande remarquable identifiée sur le sérum humain de type II n'est pas retrouvée sur les autres sérums humains de type II avéré et présumé. Il est envisageable que ces derniers ne soient pas des types II; toutefois en absence de détection d'ADN chez ces patientes, il est impossible de conclure sur ce point.

En outre, une fixation aspécifique a été mise en évidence pour les sérums non infectés. Les profils observés varient d'un sérum à l'autre chez ces patientes aux terrains identiques. On note ainsi la présence de bandes dont l'intensité est faible mais comparable à l'intensité des bandes observées chez les patients infectés. Ceci rend l'interprétation des sérums infectés difficile, en effet, cette fixation aspécifique pourrait interférer sur la lecture des WB. La présence de ces bandes compromet donc fortement le développement d'une technique de typage indirecte par WB.

III. Stratégie n°2

1. Contexte

La stratégie n°2 repose sur l'identification quasi-exhaustive des protéines antigéniques de *T. gondii* grâce à une approche non ciblée fondée sur un modèle d'infection *in vivo* puis sur l'analyse du polymorphisme de ces protéines. Depuis quelques années, les technologies de fixation d'anticorps pour les réactions de co-immunoprécipitation (co-IP) et les révélations par spectrométrie de masse ont gagné en sensibilité et en spécificité, rendant à présent possible la détection de protéines antigéniques présentes en faible quantité dans des échantillons relativement complexes. Ainsi, il est maintenant envisageable d'identifier par ces techniques un large panel de protéines antigéniques de *T. gondii* et d'en étudier par la suite le polymorphisme.

Dans le cadre du sérotypage, la recherche de polymorphisme consiste à détecter des mutations qui s'expriment au niveau protéique et qui sont spécifiques de type. Les études de polymorphisme ayant conduit au développement des tests de sérotypage présentent quelques limites qui pourraient expliquer le manque de spécificité de ces tests. Tout d'abord, ces analyses sont le plus souvent effectuées sur un faible nombre de souches : en général, seuls 1 à 2 individus représentent 1 type de souche. Ensuite, la plupart des séquences étudiées sont issues de données de séquençage Sanger. Cette technique permet d'identifier des mutations ponctuelles de type SNPs (Single Nucleotides Polymorphism) et indels (insertions/délétions) mais aucune donnée de probabilité de présence d'une mutation n'y est associée, hormis le chromatogramme. Il est alors difficile de différencier une mutation d'un artefact de séquençage. La combinaison de ces différents facteurs : le faible nombre d'individus/type de souche et la difficulté à distinguer les « vraies » mutations des artefacts de séquençage, augmente le risque d'aboutir à l'identification erronée de mutations spécifiques de type. Les techniques NGS (Next Generation Sequencing) permettent notamment le séquençage à haut débit de génomes complets. L'alignement des séquences obtenues à un génome de référence fournit des informations qualitatives et quantitatives sur chaque base identifiée, ce qui facilite la

discrimination des mutations et des artefacts dus aux erreurs de séquençage. Cette discrimination est réalisée à l'aide d'analyses d'appels de variants^{175,176}. Brièvement, celles-ci consistent à recenser toutes les mutations observées par rapport à un génome de référence, leur associer un score de qualité et les annoter en fonction de leur effet : codon stop, gain de fonction, mutation silencieuse/non silencieuse ... De plus, les techniques NGS sont plus adaptées à l'analyse d'un grand nombre de génomes. Ainsi, l'utilisation de données issues de séquençage NGS permettrait d'étudier un plus grand nombre d'individus représentatifs de chaque génotype et de renforcer les conclusions des études bio-informatiques de polymorphisme.

Compte-tenu de ces différents éléments, l'objectif est ici d'identifier un large panel de protéines antigéniques de *T. gondii* et d'en explorer le polymorphisme à partir de données de séquençage haut débit sur un nombre plus conséquent de souches. Ce travail s'est effectué en 2 temps :

1. L'identification des protéines antigéniques de *T. gondii* par une approche *in vivo* non ciblée basée sur des réactions de co-IP de tachyzoïtes avec des sérums murins hyper-immuns et leur révélation par spectrométrie de masse.
2. L'exploration *in silico* du polymorphisme de ces protéines à l'aide des données NGS de séquençage de génomes complets (WGS-Whole Genome Sequencing) de 117 souches de *T. gondii*, publiées sur la plateforme de l'ENA⁶⁵. Après une analyse d'appel de variant, le polymorphisme des 117 séquences CDS de chaque cible identifiée a été analysé selon 4 approches différentes : l'étude de SNPs par locus, l'étude de la diversité génétique de la séquence complète de chaque cible, une analyse des réseaux d'haplotype et une analyse de phylogénie. Pour les gènes ayant révélé la présence d'un polymorphisme type spécifique, une recherche d'épitope a été réalisée afin d'évaluer la possibilité de design d'un peptide type spécifique.

2. Publication n°2

Les résultats de ce travail font l'objet d'une publication scientifique en cours d'évaluation (soumis le 11/10/2023 dans Plos Neglected Tropical Diseases)

In vivo* murine approach to identify and study immunogenic proteins and their polymorphism to serotype *T. gondii

Running title: *T. gondii* serotyping

Julie Denis^{1,2}, Chloe Gommenginger², Laetitia Beal², Bernard Cimon^{3,4,5}, Anne-Sophie Deleplancque^{3,6}, Hélène Fricker Hidalgo^{3,7}, Coralie L'Ollivier^{3,8,9}, Luc Paris^{3,10}, Hervé Pelloux^{3,7}, Christelle Pomares^{3,11,12}, Sandrine Houze^{3,12,13}, Alexander W. Pfaff^{1,2}, Isabelle Villena^{3,14,15},
Odile Villard^{1,2,3}

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, UR7292 Dynamique des interactions hôte pathogène, Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

³Centre National de Référence Toxoplasmose-Pôle sérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁴Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU d'Angers, Angers, France.

⁵Angers University, Brest University, IRF, SFR 4208 ICAT, Angers, France

⁶CHU Lille, Parasitology Mycology Department, Lille University, Inserm, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, Lille, France

⁷Laboratory of Parasitology and Mycology, Grenoble-Alpes University Hospital ; Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

⁸IHU-Méditerranée Infection, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France

⁹Aix Marseille University, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, IHU Méditerranée, Marseille, France

¹⁰ Parasitology laboratory, AP-HP Sorbonne université, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹¹ Parasitology-Myology laboratory CHU Nice, INSERM 1065, C3M, Côte d'Azur University, France

¹² Parasitology laboratory, AP-HP, Hôpital Bichat - Claude Bernard, Paris, France

¹³ University of Paris Cité, IRD 261, MERIT, Paris, France

¹⁴ Department of Parasitology and Medical Mycology, National Reference Centre on Toxoplasmosis, Reims Hospital, Reims, France

¹⁵ Team EA 7510, SFR CAP-SANTE, Reims Champagne Ardenne University, Reims, France.

Abstract:

Introduction: *T. gondii* is a pathogen characterized by a large variety of strains whose virulence and clinical severity are likely linked to their genotype. Currently, the strains are genotyped using restriction fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and microsatellite markers. This typing requires the strain's DNA, which is difficult to obtain. A serotyping test could overcome the constraints of genotyping, the challenge being to identify type-specific proteins.

Material and methods: We identified immunogenic *T. gondii* proteins from co-immunoprecipitations of three tachyzoite strains (FOU, ME49, and VEG) with hyperimmune murine sera, and carried out an *in silico* polymorphism study of the identified proteins. Non-silent mutations were investigated in these candidates using the whole-genome sequences of 117 *T. gondii* strains divided into five types. Their polymorphism was analyzed by studying the single-nucleotide polymorphisms per locus, genetic diversity, haplotype networks, and phylogenetic trees.

Results: We identified 727 immunogenic proteins, including 16% GRA, ROP/RON, and SAG. Of these, 252 displayed a non-silent polymorphism. Genetic diversity analysis identified four candidates with potential type specificity. Haplotypic, phylogenetic and per-locus analyses could not confirm specificity to date.

Conclusion: Our study is the first to have identified a very large number of immunogenic *T. gondii* proteins using an *in vivo* approach. Most of these proteins could constitute novel targets for the

development of typing assays. Despite the lack of type-specific polymorphism observed, this study could lead to a pathophysiological redefinition of strain types.

Keywords : *Toxoplasma*, serotyping, strain type, immunogenic protein, mass spectrometry

Introduction

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is a pathogen that infects many animals and for which humans are a parasitic dead-end. The *Toxoplasma* genus is represented by a single species, within which there is a diversity of strains depending on geographical distribution and virulence (1–4). There are several genetic classifications of these strains. The original one describes a clonal population with three lineages, namely Types I, II, and III (2), and the so-called "atypical" strains, which display greater genetic diversity (1). Since then, the classifications have evolved by grouping the strains into 6 clades and 16 haplogroups based on restriction fragment length polymorphism (RFLP), multilocus sequence typing (MSLT), and microsatellite markers (MS) (5,6).

Among these lineages, Types II and III are considered as non-virulent and potentially cystogenic in mice and humans (7,8). Type II strains are the most widespread, particularly in Europe (90%), Africa (54%), and North America (38%) (9). Type I and atypical strains are more virulent. They are notably responsible for severe pulmonary, cerebral or, ocular damage, which does not appear to be correlated with the host's immune status. They are mainly isolated in South America, such as the Amazonian strains (83%), and in Asia (18% for Type I and 81% for atypical strains). Africa 1, detected for the first time in domestic cats, seems to be as virulent as Type I strains. It has been isolated in some cases of congenital toxoplasmosis (10–13) and severe toxoplasmosis in immunocompetent patients (14). Therefore, it appears links between the strain's genotype and its virulence in humans. Better identification of the strain types associated with severe clinical manifestations could improve the management of these cases. However, the link between the strain type and the pathophysiology of the infection is difficult to establish. Indeed, strain genotyping can only be performed with a sufficient amount of *T. gondii* DNA in the samples. This condition is rarely achieved in patients as the

infection is asymptomatic in most cases (15,16). A serotyping technique that enables indirect strain typing by antibody specificity could be a tool of paramount importance for better describing *T. gondii* epidemiology and improving patient management.

The aim of serotyping is to identify type-specific peptides that detect type-specific antibodies in patients. Several serotyping tests have been developed based on *in silico* studies to identify immunogenic proteins with type-specific polymorphisms. The most widely studied immunogenic proteins to date are those derived from apicomplexan organelles, such as dense granule proteins (GRA), microneme proteins (MIC), rhoptry (ROP/RON) proteins, and surface antigens (SAG) (17–27). A recent study investigated a wider panel of proteins by integrating *in silico* polymorphism analysis on proteins having a signal peptide (18). Indeed, secreted and surface proteins are the most likely to be immunogenic. Overall, approximately 70 *T. gondii* proteins have been analyzed for the development of serotyping tests. These include GRA6 and GRA7, the most extensively studied proteins, as well as GRA3-4 and 5, SAG1-2-3 and 4, and ROP1-5-8-16-18 and 20 (17–27). To date, serotyping tests have been developed based on type-specific peptides obtained from these proteins.

Current serotyping techniques have limited performance. While they can distinguish Type II from non-Type II, the differentiation of other types is more unreliable. A study has shown that by optimizing peptides on 1 to 3 amino acids (AA), it is possible to increase their discriminating power (28). However, even serotyping tests based on optimized peptides remain unsatisfactory. Several parameters could explain this lack of specificity. On the one hand, peptide identification is based on the study of the polymorphism of a small number of sequences for each genotype, with the exception of GRA6 and GRA7, making it difficult to state with certainty that the polymorphism observed is type-specific. On the other hand, most studies compared sequences from Type I, II, and III strains, and few include sequences from other types (Africa, Type 12, etc.). It would therefore be interesting to study the polymorphism of several strain genotypes represented by a large number of individuals. One limitation to the development of typing tests concerns the restricted number of

proteins studied, which mainly proteins are assumed to be immunogenic, such as apicomplexan proteins. The number of immunogenic proteins described for *T. gondii* is currently limited to approximately 50 (17–26,29).

The aim of our work was twofold. Firstly, we identified immunogenic proteins from *T. gondii*, using an *in vivo* approach for the first time. We detected and then identified immunogenic proteins by combining co-immunoprecipitation (co-IP) of *T. gondii* and sera from infected mice with LC-MS/MS revelation. Secondly, we studied the polymorphism of all these proteins *in silico*, in order to identify new type-specific candidate peptides. For this purpose, we used a whole-genome sequencing (WGS) database of 117 strains divided into five genotypes to identify single-nucleotide polymorphisms (SNPs), which we studied by combining complementary genetic, haplotypic, and phylogenetic diversity analyses (Figure 1).

Materials and methods

Identification of immunogenic proteins

Parasites and mice. The strains FOU (TgH00007, Africa 1), ME49 (TgA00001, Type II), and VEG (TgH00005, Type III) (CRB *Toxoplasma*, <http://www.toxocrb.com/>) were grown as tachyzoites *in vitro* on VERO cells (ATCC CCL-81). Female Swiss-Webster mice aged at least 6 weeks (RJORL:Swiss) (January) were used for infections.

Hyperimmune murine sera. Mice were infected by intraperitoneal injections of tachyzoites from the three strains, collected from *in vitro* cultures. Infectious doses were 5,000 tachyzoites for FOU and 20,000 tachyzoites for ME49 and VEG. Mice were treated with sulfadiazine (60 mg/kg/d) on D1 post-infection. Re-infection occurred 4 weeks after primary infection. Mouse sera were collected 10 weeks after primary infection.

co-IP. co-IP reactions between hyperimmune murine sera and *T. gondii* tachyzoite lysates were performed: homologous reactions (hyperimmune murine serum vs. the strain that infected the

mouse) and heterologous reactions (hyperimmune serum vs. the other two strains). Overall, three homologous and six heterologous co-IP reactions were performed in triplicate using the Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's recommendations. In brief, 10^8 tachyzoites from *in vitro* cultures were lysed, then 500µg of antigen were brought into overnight contact with mouse sera, at +4°C. The amount of serum was adjusted to reach 2µg of total IgG. Total IgGs were assayed using the Procartaplex Mouse Antibody Isotyping Panel 7-plex™ kit (Invitrogen). Elution was performed under reducing conditions.

Identification of immunogenic proteins. Proteins in the eluates were identified by LC-MS/MS on the Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) platform (<https://iphc.cnrs.fr/>) and by comparison with the ME49 reference strain via the ToxoDB and Mascot database (30,31). The quality of the identification of each protein was assessed on the basis of coverage rates and the number of specific peptides used to identify them. Proteins were categorized using the Gene Ontology (GO) classification with PANTHER (v17.0).

Study of immunogenic protein polymorphism

SNP detection. Candidate gene polymorphism analysis was performed on WGS data from 117 *T. gondii* isolates: 15 Africa 1, 48 Type II, 19 Type III, 15 Amazonian, and 20 “other” types (Table 1) (32). WGS data were downloaded from the ENA platform (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>). Sequences were aligned and assembled against the ME49 reference genome (GCA_000006565.2, 2018). The SNPs were obtained after variant calling analysis, and the coding sequences of the 117 strains were extracted for each of the candidate genes. Non-synonymous SNPs (which may impact protein recognition by the immune system) that were present in at least three of the 117 strains (minimum number of types studied) were analyzed (Figure S1).

Polymorphism per locus. To determine whether SNPs were representative of one of the five strain types (Table 1), the coding sequences of the 117 strains were translated and aligned with Mega — (v11.0.13). The rate of strains presenting a SNP at a given locus was calculated within each type.

Genetic diversity. We studied the genetic diversity of candidate genes to determine whether a gene was characteristic of a strain type. Genes were considered characteristic of a type if they showed, on the one hand, significant genetic diversity over the total population of 117 strains and, on the other hand, a non-significant diversity within the type but a significant diversity between this type and the others. For this purpose, we estimated the Tajima's D neutrality test ($p \leq 0.05$) and the pairwise full-field stimulus threshold test ($p \leq 0.05$) using DnaSP (v6.12.3) (33) and Arlequin (v3.5.2.2) (34). Nucleotide (π) and haplotidic (Hd) diversity indices were calculated with DnaSP.

Haplotype networks. Haplotype networks can be used to group together individuals with close haplotypes and to estimate the distance between haplotypes. For each candidate gene, haplotype networks were studied in order to determine whether one of the haplotypes only included strains belonging to the same type. The networks were constructed using the Median-Joining method with PopArt (v1.7) (35).

Phylogenetic study. A phylogenetic analysis of each gene was carried out to determine whether the sequences were distributed in clades, and whether the observed clades were consistent with strain types. Phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood algorithm (1000 bootstraps) with Mega (v11.0.13).

Epitope prediction. For candidates with a polymorphism that could be linked to one or more types, B epitopes were predicted using BepiPred 2.0 software on the Immune Epitope Database (IEDB) server (<https://www.iedb.org/>).

Results

Identification of immunogenic proteins

Co-IP reactions coupled with LC-MS/MS enabled the detection and identification of 727 immunogenic proteins: 313 identified only in homologous reactions, 44 only in heterologous reactions, and 370 in both types of reaction (Table 2, S1). Their identification was validated according to the following parameters: coverage rate and number of peptides used for identification. The coverage rate was high for most identified proteins, while the number of peptides varied from one protein to another: high for those identified in a large number of co-IP reactions, and lower for those identified in a small number of reactions, suggesting low concentrations of these proteins (Table 2). Of the 727 proteins, 23% (171/727) were intra-cytoplasmic, 20% (146/727) intra-membrane, 16% (114/727) apicomplexan, 13% (93/727) hypothetical, 5% (37/727) intra-nuclear, and finally 23% (166/727) not referenced in the GO classification. Out of the 727 proteins, 686 (94%) were described for the first time as immunogenic. Notably, we identified 79 apicomplexan proteins not studied in serotyping tests. These included 35 GRA, 14 MIC, 9 RON, 14 ROP, and 7 SAG-related sequence (SRS) proteins (Table 3). Interestingly, 20 apicomplexan proteins were detected only in homologous co-IP reactions. We also identified 13% (93/727) of hypothetical immunogenic proteins, 62% (58/93) of which were detected only in homologous reactions (Table 2). The polymorphism study was carried out on all 727 candidates identified.

Polymorphism analysis

Polymorphism determination. SNPs associated with non-silent changes in the coding regions of the 727 candidate genes were studied on the 117 strains in the database. Of these 727 genes, 654 showed at least one SNP associated with non-synonymous mutations, and for 252 of them, at least one SNP was present on more than three of the 117 strains (Table S1). These included 71 apicomplexan genes, 46 of which have never been studied (Table 3), and 41 hypothetical protein genes. These 252 genes were therefore retained for further analysis in the study.

Polymorphism analysis per locus. For the 252 genes included in the polymorphism study, 3,792 SNPs were found. Only 986 were associated with non-silent mutations and were present in at least three strains. On average, there were four mutated AA loci per protein (from 1 to 26), which were 77 AA apart (from 1 to 2,902). Most of the observed mutations were substitutions. For only 42/986 loci, three AA were observed: the consensus AA and two others (Figure 2). Furthermore, we observed 4.6 % (from 2.5 to 53 %) of the strains are mutated. The type II strain population was homogeneous as the Amazonian strain population, with very few mutations, whereas others strains types were much more heterogeneous. (Figure 2). Only 32/986 SNPs correspond to a protein mutation on more than 75% of the strains for at least 1 type. For each SNPs, the proportion of strains exhibiting the corresponding protein mutation was calculated (Figure 3). Only 21 loci of proteins mutations are present on more than 75% of the strains of the 1 to 3 main genotypes (africa 1, II, type III amazonian). Among them, the mutations representing each type were selected based on the following criteria: mutations present on more than 97% of the strains type and less than 30% of the strains of the others type. We retained 2 mutations for type II (ROP8-537 and ROP5-115), 2 for the Amazonian type (ROP7-230 and TGME49_279100-253), 3 for type III (TGME49_204050-599, TGME49_204050-601 and TGME49_279100-63) and no mutations were found for the Africa 1 type (Figure 3). However, the TGME49_279100-14 mutation is present at more than 97% on the Africa 1 and type III. All the mutations selected above are present in more than 75% of strains of at least one of the non-main types (Africa 3, Africa 4, Caribbean, type I, type II). Furthermore, none of them correspond to an antigenic zone (Table S2).

Analysis of genetic diversity. From the 117 strains, we assessed the genetic diversity of the 252 genes included. The rate of mutated AAs, number of haplotypes, haplotypic diversity, and nucleotide diversity averaged 0.8% [0.1-8], 8.5 [2-68], 0.22 [0.03-0.94,], and 18×10^{-5} [$1.5 \cdot 10^{-5}$ - $4 \cdot 10^{-3}$], respectively (Table S3).

Genetic heterogeneity was observed in the total population for five encoding genes: MIC15 (TGME49_247195), peptidase M16 (TGME49_202680), RNA recognition motif-containing protein (TGME49_209850), and two hypothetical proteins (TGME49_310210 and TGME49_321370) (Table S3). Two of them showed genetic homogeneity within one type and genetic diversity between that type vs. the others (Table 4). The Type II-representative gene encoded the RNA recognition motif-containing protein (TGME49_209850). The gene representing the group "other type" encoded the hypothetical TGME49_321370 protein. The M16 peptidase gene sequences of Type II strains were significantly different from non-Type II sequences, but the Type II sequences were not homogeneous among themselves. The same applied to the gene of the RNA recognition motif-containing protein, MIC15, and hypothetical TGME49_321370 protein for Type III/"other type", Amazonian, and Type II, respectively (Table 4). As a result of the genetic diversity study, four of the five candidates can be retained to represent types II, III, Amazonian, and "other".

Type-specific proteins. These four candidates had 11, 18, 7 and, 19 mutation positions, respectively. The search for epitopes for these four proteins revealed a low number of peptides containing a polymorphic position: two for peptidase M16, one for RNA recognition protein, one for MIC 15, and two for TGME49_321370. For these epitopes, no AA that could be associated with a strain type could be identified (Figure 4). These four proteins cannot be used to determine peptides for the development of a typing test. Of the 6 SNPs identified by locus analysis, none is associated with the presence of a protein epitope.

Haplotype networks. For each of the 252 genes included, the study of haplotype networks showed that haplotypes were very close to one another and interconnected. In addition, the distribution of the strains within haplotypes did not correspond to their type distribution. This observation applied to all the genes studied, including the four displaying a type-representative genetic diversity (Figure 4).

Phylogenetic study. The study of the phylogenetic trees for each of the 252 genes showed, once again, that the sequences were very close to each other. In fact, no statistically significant clade distribution was observed. When clusters were observed, they were close to each other, and the distribution of strains within these clusters was not consistent with strain type.

Discussion

The roles of *T. gondii* proteins in infection are gradually being elucidated, yet the antigenicity of these proteins is still poorly described, indeed, the antigenicity of only approximately 50 proteins has been described, thanks to studies evaluating their potential in vaccine immunity and to proteomic analyses (17–26,29). These include approximately 15 apicomplexan proteins, such as GRA4-5-6-7, ROP12-16, MIC3-8, and SAG1 and 2. However, the identification of these antigenic proteins remained incomplete due to the limitations of the techniques used. Thanks to co-IP reactions coupled with MS revelation, we were able to identify for the first time a large panel of 727 immunogenic *T. gondii* proteins for Africa 1, II, and III types. These included 16% apicomplexan proteins, most of which had not yet been formally described as antigenic, as well as a number of hypothetical proteins (13%). Our study has therefore identified novel targets using an original *in vivo* approach for the study of polymorphism as part of the development of a serotyping technique.

The co-IP reactions carried out showed that 2/3 of the proteins were identified in all co-IPs: both homologous and heterologous reactions. This suggests that these proteins do not elicit a type-specific immune response. This group included most of the proteins for which serotyping tests have been developed, including GRA6 and GRA7. The remaining third of proteins were identified only in homologous co-IP reactions, which suggest that they might elicit a type-specific immune response. However, no type-specific polymorphism was observed for them, regardless of the analyzed parameters. These proteins may in fact be present in heterologous reactions, but undetectable. Indeed, the number of specific peptides that led to their identification by LC-MS/MS was low, which may suggest low concentrations of these proteins in the reactions. It is therefore not an option to use

the presence or absence of proteins in homologous and/or heterologous co-IP reactions as a basis for defining candidates for a typing test. A polymorphism study was thus carried out on all 727 identified proteins.

Polymorphism analysis of these 727 candidates was performed on a large cohort of 117 previously typed *T. gondii* strains (32). This large panel allows substantial representation of four main strain types, *i.e.*, African 1, Type II, Type III and Amazonian, and a lower representation of a few other types. Analysis of WGS data eliminates the bias associated with point mutations by retaining only those that are best represented. Initial observations have shown that there are a significant number of point SNPs that were present in only one or two strains or were not expressed at protein level. The SNPs included in the analysis were present in a limited number of strains, and their distribution was independent of strain type. This is consistent with the high number of haplotypes identified for certain genes. For variant calling, we chose to use non-stringent selection criteria for SNPs, to avoid the elimination of any interesting polymorphism. Indeed, previous studies have demonstrated that changing an AA on a peptide could improve inter-type discrimination (21). However, despite the high number of SNPs included, we observed very little variation between strains. Previous studies have shown that a change of just a few AA could alter the conformation of a protein and therefore its epitopes (36). Despite the low rate of polymorphism observed per locus and per protein, it is interesting to study the distribution of mutations within the different types. The study of SNPs per locus allowed the identification of eight mutations representing the four main genotypes: Africa 1, type II, type III, and Amazonian. Unfortunately, these mutations are also present in the other genotypes: Africa 3, Africa 4, Caribbean, type I and type 12. Considering the low number of representatives for each type (3 to 7), it is impossible to determine the ability of these markers to discriminate the strain types without implementing the NGS database. Genetic diversity analysis revealed statistically significant differences between the sequences of strain types for four genes out of the 727 initially studied. So, only few mutations seem to be able to discriminate genotype. Interestingly, the markers identified were not the same for these 2 types of analyses. Besides, the

search for epitopes did not reveal any antigenic peptides in the polymorphism zones of the protein identified. Finally, the study of haplotype networks, and phylogenetic trees did not confirm this result, reinforcing the hypothesis that these candidates have therefore only a limited usefulness in serotyping. However, the search was restricted to B epitopes on primary sequences. In this context, it would be interesting to use the 3D structure of our candidates, but to date, the databases for this type of study do not provide a sufficiently reliable estimate of the conformation of our four proteins. Finally, when the data are analyzed protein by protein, no type-specific mutation is identified. One solution to overcome this lack of specific mutation would be to consider combined peptides. However, no combination of mutations seems to be able to recognize all strains of the main types studied.

In this work, we did not find the targets previously studied in serotyping. Indeed, when aligning the sequences of some of the peptides already described (GRA6-7-8, ROP18-26, and 39) against the peptide sequences of our data (18,20,20), we did not find the type-specific polymorphisms described, except for one of the GRA6 Type III-specific peptides. For this peptide, we actually found the described type-specific AA (18), present only in three Amazonian strains, two Africa Type 1, and the three Africa Type III strains, and absent from Type III sequences (data not shown). The study of a larger number of sequences did not reveal the polymorphisms observed in previous studies. Thus, it can be hypothesized that the specific polymorphisms previously detected are point mutations, not representative of a particular type.

Here, we identified polymorphic immunogenic proteins, including apicomplexan proteins, but the polymorphism observed cannot be linked to strain types in our population. Strains are currently typed using 15 MS markers that are not expressed at protein level and are not involved in strain virulence (5,6). As evoked by Sousa *et al.*(37), it appears difficult to match a classification based on MS markers with a polymorphism expressed at the protein level, as this could compromise the development of serotyping tests based on the detection of type-specific antibodies to discriminate

between different types of strains in patients. An interesting diagnostic alternative could be to define a "serotypic" classification linking a polymorphism of one or more proteins to one or more potential clinical manifestations/severity signs in patients. However, a reliable identification of protein polymorphisms would require the isolation of a large number of strains, including those associated with mild clinical manifestations.

Conclusion

Thanks to its *in vivo* approach, our study is the first to have identified a large panel of immunogenic proteins, most of which had never been formally described before. The strength of this *in silico* study lies in the use of WGS data to identify SNPs in a large population representative of four strain types. Among the immunogenic proteins identified, the polymorphism observed was rare and could not be linked to type, thereby questioning the value of serotyping tests as they are currently defined. However, this work paves the way for a potential pathophysiological reevaluation of strain types.

Acknowledgements:

The authors acknowledge the support of the Freiburg Galaxy Team: Björn Grüning, Bioinformatics, University of Freiburg (Germany), funded by the Collaborative Research Centre 992 Medical Epigenetics (DFG grant SFB 992/1 2012), and the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF grant 031 A538A de.NBI-RBC).

Tables and figures:

Table 1: Type of *T. gondii* strains used in the polymorphism study. Strains were typed on 15 microsatellite markers (32).

Table 2: Distribution of the different categories of proteins identified according to the type of co-IP reaction: homologous (hyperimmune murine serum vs. the strain that infected the mouse) and/or heterologous (hyperimmune serum vs. the two other strains). Cov: coverage; spe pep: specific peptides

Table 3: List of immunogenic apicomplexan proteins from co-immunoprecipitation reactions.

Table 4: Intra-type genetic sequence homogeneity (Tajima's D p-value >0.05) and inter-type sequence diversity (pairwise FST p-value <0.05) for the five genes showing significant genetic diversity in the total population of 117 strains. n.s: not significant, * p<0.05, ** p<0.02.

Figure 1: Study design.

Figure 2: Protein mutations observed in at least three out of 117 strains, according to strain type, for all non-silent polymorphism proteins. For each strain (horizontal) and mutation position (vertical), black squares correspond to the presence of the amino acids (AA) of the consensus sequence, colored squares correspond to the presence of a mutated AA (red: the most frequent mutated AA on a locus, green: the minority mutated AA on a locus).

Figure 3: Rate of strain with the same mutation within a genotype. **Bold :** mutations present on more than 97% of the strains type and less than 30% of the strains of the others type

Figure 4: Haplotype networks for the four genes showing genetic diversity. Circles represent strains with the same haplotype. Trait length is proportional to the genetic distance between haplotypes. Haplotype networks were constructed using the Median-Joining method and PopArt (v1.7) software.

Supplementary material:

Figure S1: Variant calling analysis workflow. MQ: mapping quality. Cov: Coverage. QUAL: Quality. DPB: total read depth per bp at the locus. MQMR: mean mapping quality of observed reference alleles. MQM: mean mapping quality of observed alternate alleles. *scripts adapted from (<https://github.com/myonaung/Naung-et-al-2021>)

Table S1: All immunogenic proteins identified in the various co-immunoprecipitation reactions, along with the presence of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the sequences and the presence of SNPs in at least three out of 117 strains.

Table S2: Protein mutations present on more than 75% of the strains for at least 1 type.

Grey cells : mutations present on more than 97% of the strains type and less than 30% of the strains of the others type

Table S3: All immunogenic proteins identified in co-immunoprecipitation reactions. Haplotype number, mutated amino acid rate, haplotypic diversity (Hd), nucleotide diversity, and Tajima's D index and its p-value were evaluated with DnaSP software (v6.12.3).

References:

1. Galal L, Hamidović A, Dardé ML, Mercier M. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. Food Waterborne Parasitol. juin 2019;15:e00052.
2. Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, « new » genotypes and virulence. Parasite Paris Fr. sept 2008;15(3):366-71.
3. Lachkhem A, Galal L, Lahmar I, Passebosc K, Riahi H, Plault N, et al. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from domestic animals in Tunisia. Sci Rep. 29 avr 2021;11(1):9328.
4. Bertranpetit E, Jombart T, Paradis E, Pena H, Dubey J, Su C, et al. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. mars 2017;48:150-5.
5. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. déc 2010;48(12):4641-5.
6. Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. Nat Commun. 7 janv 2016;7:10147.
7. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. déc 1995;172(6):1561-6.
8. Saraf P, Shwab EK, Dubey JP, Su C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. Exp Parasitol. mars 2017;174:25-30.
9. Galeh TM, Sarvi S, Hosseini SA, Daryani A. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from rodents in the world: A systematic review. Transbound Emerg Dis. mai 2022;69(3):943-57.
10. Can H, Döşkaya M, Ajzenberg D, Özdemir HG, Caner A, İz SG, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of İzmir, Turkey. PloS One. 2014;9(8):e104930.
11. Döşkaya M, Caner A, Ajzenberg D, Değirmenci A, Dardé ML, Can H, et al. Isolation of

Toxoplasma gondii strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. Parasitol Int. oct 2013;62(5):471-4.

12. Döskaya M, Degirmenci A, Çiçek C, Ak M, Korkmaz M, Gürüz Y, et al. Behaviour of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain tachyzoites during continuous production in various cell lines. Parasitology. mars 2006;132(Pt 3):315-9.

13. Şahar EA, Can H, İz SG, Döşkaya AD, Kalantari-Dehaghi M, Deveci R, et al. Development of a hexavalent recombinant protein vaccine adjuvanted with Montanide ISA 50 V and determination of its protective efficacy against acute toxoplasmosis. BMC Infect Dis. 10 juill 2020;20(1):493.

14. Leroy J, Houzé S, Dardé ML, Yéra H, Rossi B, Delhaes L, et al. Severe toxoplasmosis imported from tropical Africa in immunocompetent patients: A case series. Travel Med Infect Dis. 2020;35:101509.

15. Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors. 28 mai 2015;8:292.

16. Picone O, Fuchs F, Benoist G, Binquet C, Kieffer F, Wallon M, et al. Toxoplasmosis screening during pregnancy in France: Opinion of an expert panel for the CNGOF. J Gynecol Obstet Hum Reprod. sept 2020;49(7):101814.

17. Xicoténcatl-García L, Enriquez-Flores S, Correa D. Testing New Peptides From *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA6, and GRA7 for Serotyping: Better Definition Using GRA6 in Mother/Newborns Pairs With Risk of Congenital Transmission in Mexico. Front Cell Infect Microbiol. 23 oct 2019;9:368.

18. Arranz-Solís D, Cordeiro C, Young LH, Dardé ML, Commodaro AG, Grigg ME, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* Infection Using Peptide Membrane Arrays. Front Cell Infect Microbiol. 29 nov 2019;9:408.

19. Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Dardé ML. Use of GRA6-Derived Synthetic Polymorphic Peptides in an Immunoenzymatic Assay To Serotype *Toxoplasma gondii* in Human Serum Samples Collected from Three Continents. Clin Vaccine Immunol. sept 2008;15(9):1380-6.

20. Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, da Costa JC, et al. Selection of Polymorphic Peptides from *GRA6* and *GRA7* Sequences of *Toxoplasma gondii* Strains To Be Used in Serotyping. Clin Vaccine Immunol. août 2009;16(8):1158-69.

21. Maksimov P, Zerweck J, Dubey JP, Pantchev N, Frey CF, Maksimov A, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in Cats (*Felis domesticus*) Reveals Predominance of Type II Infections in Germany. Wilson EH, éditeur. PLoS ONE. 7 nov 2013;8(11):e80213.

22. Can H, Aksoy Gökmen A, Döşkaya M, Erkunt Alak S, Değirmenci Döşkaya A, Karakavuk M, et al. Development of a new serotyping ELISA for *Toxoplasma gondii* type II, type III and Africa 1 lineages using in silico peptide discovery methods, well categorized feline and human outbreak serum samples. BMC Infect Dis. 31 janv 2022;22(1):110.

23. Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. J Infect Dis. 1 mai 2003;187(9):1484-95.

24. Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, Petersen E, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.* août 2006;8(9-10):2333-40.
25. Morisset S, Peyron F, Lobry JR, Garweg J, Ferrandiz J, Musset K, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect.* juin 2008;10(7):742-7.
26. Xiao J, Buka SL, Cannon TD, Suzuki Y, Viscidi RP, Torrey EF, et al. Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes Infect.* nov 2009;11(13):1011-8.
27. Li R, Ma Y, Li J, Zhou P, Zheng F, Liu Q, et al. Application of *Toxoplasma gondii* GRA15 peptides in diagnosis and serotyping. *Microb Pathog.* juin 2020;143:104168.
28. Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science.* 5 oct 2001;294(5540):161-5.
29. Mamaghani AJ, Fathollahi A, Arab-Mazar Z, Kohansal K, Fathollahi M, Spotin A, et al. *Toxoplasma gondii* vaccine candidates: a concise review. *Ir J Med Sci.* févr 2023;192(1):231-61.
30. Ramus C, Hovasse A, Marcellin M, Hesse AM, Mouton-Barbosa E, Bouyssié D, et al. Spiked proteomic standard dataset for testing label-free quantitative software and statistical methods. *Data Brief.* mars 2016;6:286-94.
31. Amos B, Aurrecochea C, Barba M, Barreto A, Basenko EY, Bazant W, et al. VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Res.* 7 janv 2022;50(D1):D898-911.
32. Galal L, Arieu F, Gouilh MA, Dardé ML, Hamidović A, Letourneur F, et al. A unique *Toxoplasma gondii* haplotype accompanied the global expansion of cats. *Nat Commun.* 1 oct 2022;13(1):5778.
33. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol.* 1 déc 2017;34(12):3299-302.
34. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* mai 2010;10(3):564-7.
35. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* janv 1999;16(1):37-48.
36. Lamminmäki U, Batra G, Saviranta P. Array-In-Well Epitope Mapping of Phage-Displayed Antibodies. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2018;1785:129-40.
37. Sousa S, Fernandes M, Correia Da Costa JM. Serotyping, a challenging approach for *Toxoplasma gondii* typing. *Front Med.* 6 avr 2023;10:1111509.

Table 1: Type of *T. gondii* strains used in the polymorphism study.

Strains were typed on 15 microsatellite markers (35).

Type	N° of strains (human strain)
Africa 1	15 (5)
Type II	48 (4)
Type III	19 (1)
Amazonienne	15 (3)
Others :	20 (6)
Type I	3
Type 12	3 (2)
Africa 3	4
Africa 4	3
Caribbean	7 (4)

Table 2: Distribution of the different categories of proteins identified according to the type of co-IP reaction: homologous (hyperimmune murine serum vs. the strain that infected the mouse) and/or heterologous (hyperimmune serum vs. the two other strains). Cov: coverage; spe pep: specific peptides

	Co-IP								
	Homologous			Heterologous			Homologous and heterologous		
	Nb proteins	Mean cov	Mean spe pep	Nb proteins	Mean cov	Mean spe pep	Nb proteins	Mean cov	Mean spe pep
Total	313	40	8	44	24	7	370	66	28
Apicomplexes	20	54	9	3	19	10	91	89	44
GRA	8	na	na	1	na	na	40	na	na
ROP	3	na	na	1	na	na	22	na	na
RON	0	na	na	1	na	na	8	na	na
MIC	6	na	na	0	na	na	9	na	na
SAG	3	na	na	0	na	na	12	na	na
Hypothetical	58	34	8	6	31	5	29	46	20
Others	235	34	8	35	22	7	250	63	21

Table 3: List of immunogenic apicomplexan proteins from co-immunoprecipitation reactions.

Accession nb	Protein description	no synonymous SNP	no synonymous SNP Present on ≥ 3 strains	Accession nb	Protein description	no synonymous SNP	no synonymous SNP Present on ≥ 3 strains
TGME49_222170	DG32 antigen	yes	no	TGME49_310010	RON1	yes	yes
TGME49_297880	DG32 protein	yes	no	TGME49_300100	RON2	yes	yes
TGME49_270250	GRA1	yes	no	TGME49_294400	RON2L1	yes	yes
TGME49_227280	GRA3 ^{21,26}	yes	yes	TGME49_223920	RON3	yes	yes
TGME49_310780	GRA4	yes	yes	TGME49_229010	RON4	yes	yes
TGME49_286450	GRA5 ^{21,24,27,28}	yes	yes	TGME49_253370	RON4L1	yes	no
TGME49_275440	GRA6 ^{20,21,22,23,24,25,26,27,28}	yes	yes	TGME49_311470	RON5	yes	no
TGME49_203310	GRA7 ^{20,21,22,23,24,25,26}	yes	yes	TGME49_306060	RON8	yes	yes
TGME49_254720	GRA8 ²¹	yes	yes	TGME49_230350	RON11	yes	yes
TGME49_255540	GRA9 ²¹	yes	no	TGME49_309590	ROP1 ^{21,26}	yes	yes
TGME49_288650	GRA12	yes	yes	TGME49_295125	ROP4	yes	no
TGME49_220890	GRA12A	yes	yes	TGME49_308090	ROP5 ²¹	yes	yes
TGME49_275860	GRA12B	yes	no	TGME49_258660	ROP6	yes	no
TGME49_239740	GRA14 ²¹	yes	yes	TGME49_295110	ROP7	yes	yes
TGME49_208830	GRA16	yes	yes	TGME49_215775	ROP8 ²¹	yes	yes
TGME49_288840	GRA18	yes	no	TGME49_243730	ROP9 ²¹	no	no
TGME49_227620	GRA2	yes	no	TGME49_227810	ROP11 ²¹	no	no
TGME49_215220	GRA22	yes	yes	TGME49_203990	ROP12	yes	no
TGME49_230180	GRA24	yes	yes	TGME49_312270	ROP13	yes	no
TGME49_290700	GRA25	yes	yes	TGME49_315220	ROP14	yes	yes
TGME49_269690	GRA29	yes	yes	TGME49_211290	ROP15	yes	no
TGME49_232000	GRA30	yes	yes	TGME49_262730	ROP16 ²¹	yes	yes
TGME49_220240	GRA31 ²¹	yes	yes	TGME49_258580	ROP17 ²¹	yes	no
TGME49_212300	GRA32	yes	no	TGME49_205250	ROP18 ²¹	yes	yes
TGME49_247440	GRA33	yes	yes	TGME49_263220	ROP21	yes	yes
TGME49_203290	GRA34	yes	yes	TGME49_252360	ROP24	yes	no
TGME49_226380	GRA35	yes	yes	TGME49_202780	ROP25 ²¹	yes	yes
TGME49_213067	GRA36	yes	no	TGME49_211260	ROP26 ²¹	yes	yes
TGME49_312420	GRA38	yes	yes	TGME49_215785	ROP2A	no	no
TGME49_313440	GRA38	yes	no	TGME49_201130	ROP33	no	no
TGME49_289380	GRA39	yes	yes	TGME49_240090	ROP34	yes	yes
TGME49_219810	GRA40	yes	yes	TGME49_304740	ROP35	yes	yes
TGME49_236870	GRA42	yes	no	TGME49_262050	ROP39 ²¹	yes	yes
TGME49_237015	GRA43	yes	yes	TGME49_291960	ROP40 ²¹	yes	yes
TGME49_203600	GRA50	yes	yes	TGME49_210370	ROP54	yes	no
TGME49_319340	GRA52	yes	yes	TGME49_321480	SRS12B	yes	yes
TGME49_204340	GRA54	yes	yes	TGME49_319350	SRS17B	yes	yes
TGME49_309760	GRA55 ²¹	yes	no	TGME49_285870	SRS20A	yes	yes
TGME49_217680	GRA57	yes	yes	TGME49_213280	SRS25 ²¹	yes	no
TGME49_268790	GRA58*	yes	yes	TGME49_258550	SRS28	yes	no
TGME49_316250	GRA59	yes	yes	TGME49_233450	SRS29A ²¹	yes	no
TGME49_269950	GRA61	yes	yes	TGME49_233460	SRS29B ²¹	yes	yes
TGME49_217530	GRA63	yes	no	TGME49_233480	SRS29C ²¹	yes	yes
TGME49_202620	GRA64 ²¹	yes	yes	TGME49_271050	SRS34A ²¹	yes	yes
TGME49_241240	GRA65	yes	yes	TGME49_280570	SRS35A ²¹	yes	yes
TGME49_308970	GRA68 ²¹	yes	yes	TGME49_264660	SRS44	yes	yes
TGME49_249990	GRA70	yes	no	TGME49_308840	SRS51 ²¹	yes	yes
TGME49_309600	GRA71	yes	yes	TGME49_315320	SRS52A	yes	no
TGME49_272460	GRA72	yes	no	TGME49_308020	SRS57 ²¹	yes	no
TGME49_291890	MIC1	yes	no	TGME49_226860	SRS67	yes	no
TGME49_201780	MIC2	yes	no				
TGME49_214940	MIC2-MAP	yes	yes				
TGME49_319560	MIC3 ²¹	yes	no				
TGME49_208030	MIC4	yes	no				
TGME49_277080	MIC5	yes	yes				
TGME49_218520	MIC6	yes	yes				
TGME49_245490	MIC8	yes	no				
TGME49_260190	MIC13	yes	yes				
TGME49_247195	MIC15	yes	yes				
TGME49_200230	MIC17	yes	yes				
TGME49_294790	MIC19	yes	no				
TGME49_283540	MIC20	yes	no				
TGME49_208730	putative	yes	yes				
TGME49_208740	putative	yes	no				

Table 4: Intra-type genetic sequence homogeneity (Tajima's D p-value >0.05) and inter-type sequence diversity (pairwise FST p-value <0.05) for the five genes showing significant genetic diversity in the total population of 117 strains. n.s : not significant, * p<0.05, ** p<0.02.

Accession nb	Protein description	p Tajima's					p FST					Type
		II	Af 1	III	Amaz	other	II vs not II	Af1 vs not Af1	III vs not III	Amaz vs not Amaz	Other vs not other	
TGME49_202680	peptidase M16, alpha subunit, putative	n.s.	*	*	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	II
TGME49_209850	RNA recognition motif-containing protein	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	*	*	II-III- rares
TGME49_247195	microneme protein MIC15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	Amaz
TGME49_310210	hypothetical protein	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TGME49_321370	hypothetical protein	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	II-Rares

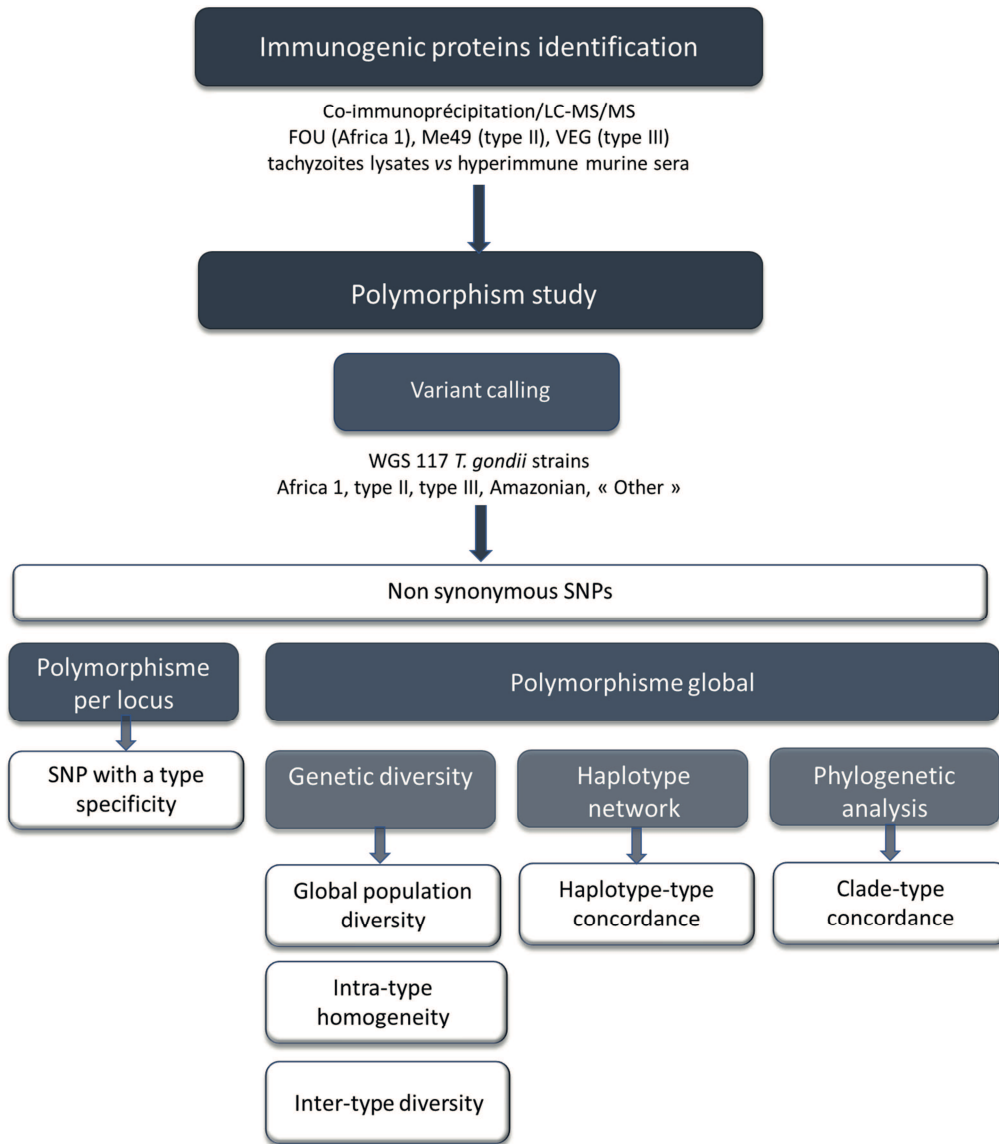


Figure 1 : Study design.

Partie 2 : identification de marqueurs de sérotypage-Stratégie 2

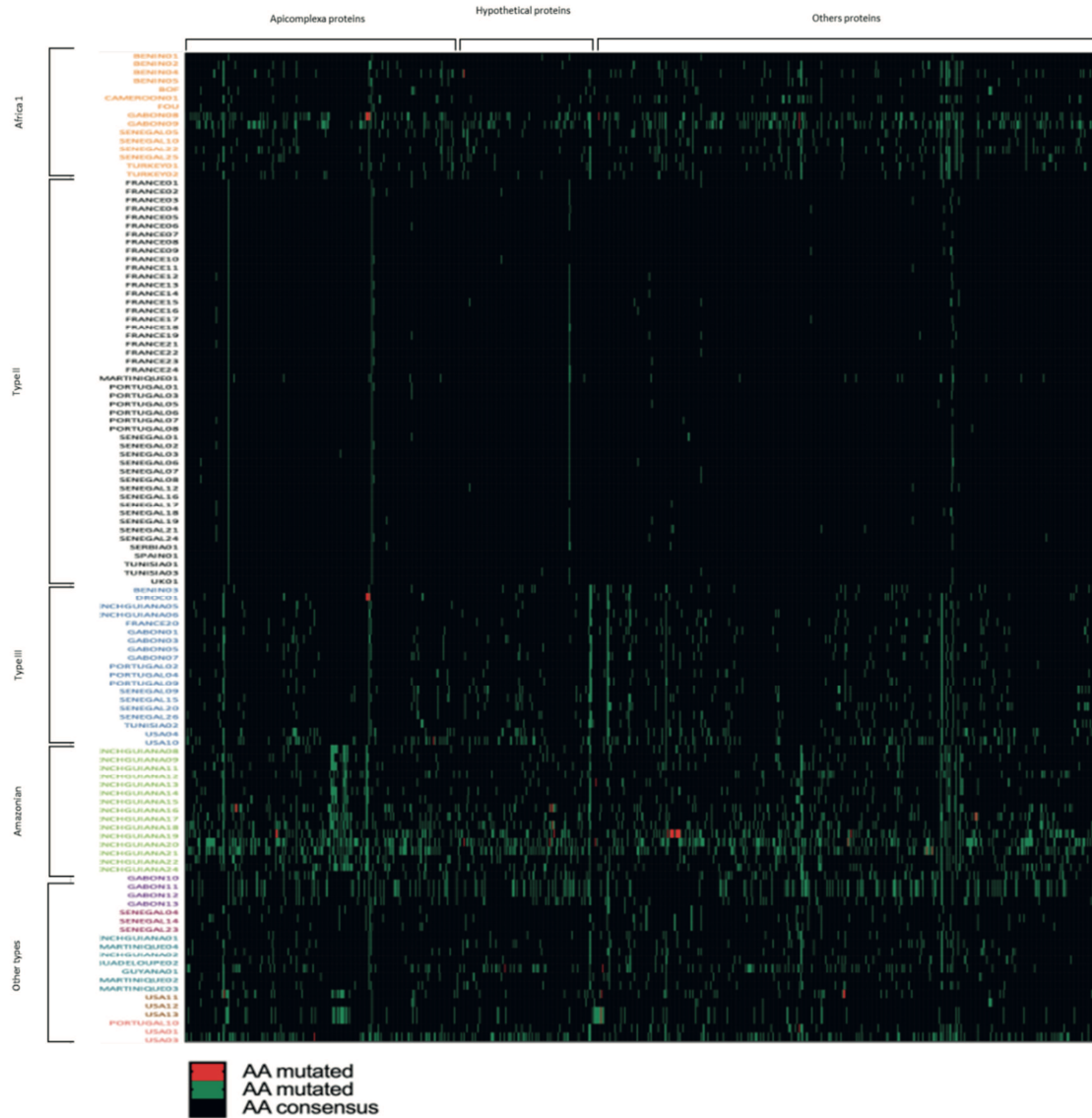


Figure 2: Protein mutations observed in at least three out of 117 strains, according to strain type, for all non-silent polymorphism proteins. For each strain (horizontal) and mutation position (vertical), black squares correspond to the presence of the amino acids (AA) of the consensus sequence, colored squares (green and red) correspond to the presence of a mutated AA.

Partie 2 : identification de marqueurs de sérotypage-Stratégie 2

Accession number	Protein name	Locus AA	Africa 1	Type II	Type III	Amazonian	Africa 3	Africa 4	Caribbean	Type 12	Type I
TGME49_215775	ROP8	537									
TGME49_217680	GRA57	1662									
TGME49_264660	SRS44	2196									
TGME49_295110	ROP7	230									
		289									
TGME49_308090	ROP5	7									
		15									
		38									
		74									
		115									
		485									
TGME49_213460	Hypothetical protéin	1373									
TGME49_321700	Hypothetical protéin	67									
TGME49_202610	Phosphatase 2C domain-containing protein PPM3D	138									
		242									
TGME49_204050	Subtilisin SUB1	599									
		601									
		606									
TGME49_209755	Cyst matrix protein MAG2	930									
TGME49_211690	AAA family protein	1345									
TGME49_240060	Inhibitor of STAT1 transcription	358									
TGME49_251170	KRUF family protein	238									
TGME49_279100	Mitochondrial association factor 1a	14									
		63									
		66									
		143									
		155									
		188									
		253									
		348									
416											
TGME49_284050	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	237									

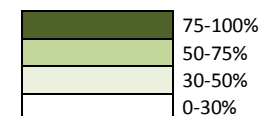


Figure 3: Rate of strain with the same mutation within a genotype. **Bold** : mutations present on more than 97% of the strains type and less than 30% of the strains of the others type

Partie 2 : identification de marqueurs de sérotypage-Stratégie 2

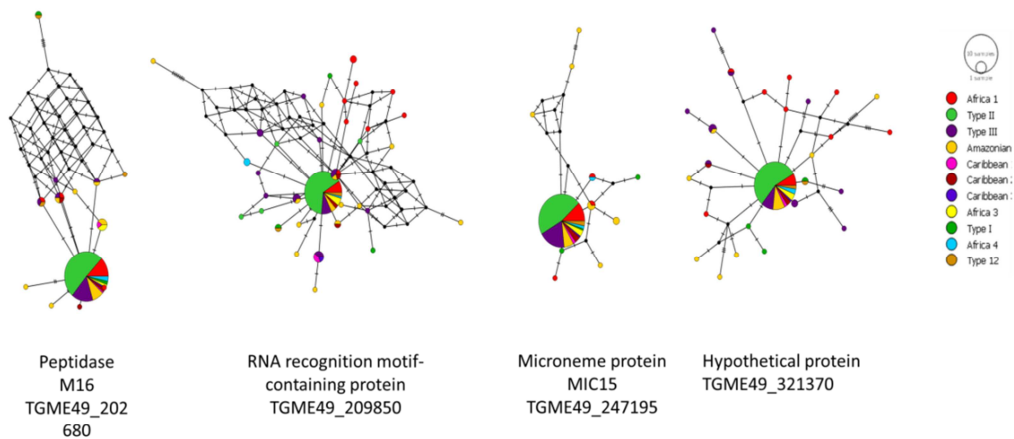


Figure 4 : Haplotype networks for the four genes showing genetic diversity. Circles represent strains with the same haplotype. Trait length is proportional to the genetic distance between haplotypes. Haplotype networks were constructed using the Median-Joining method and PopArt (v1.7) software.

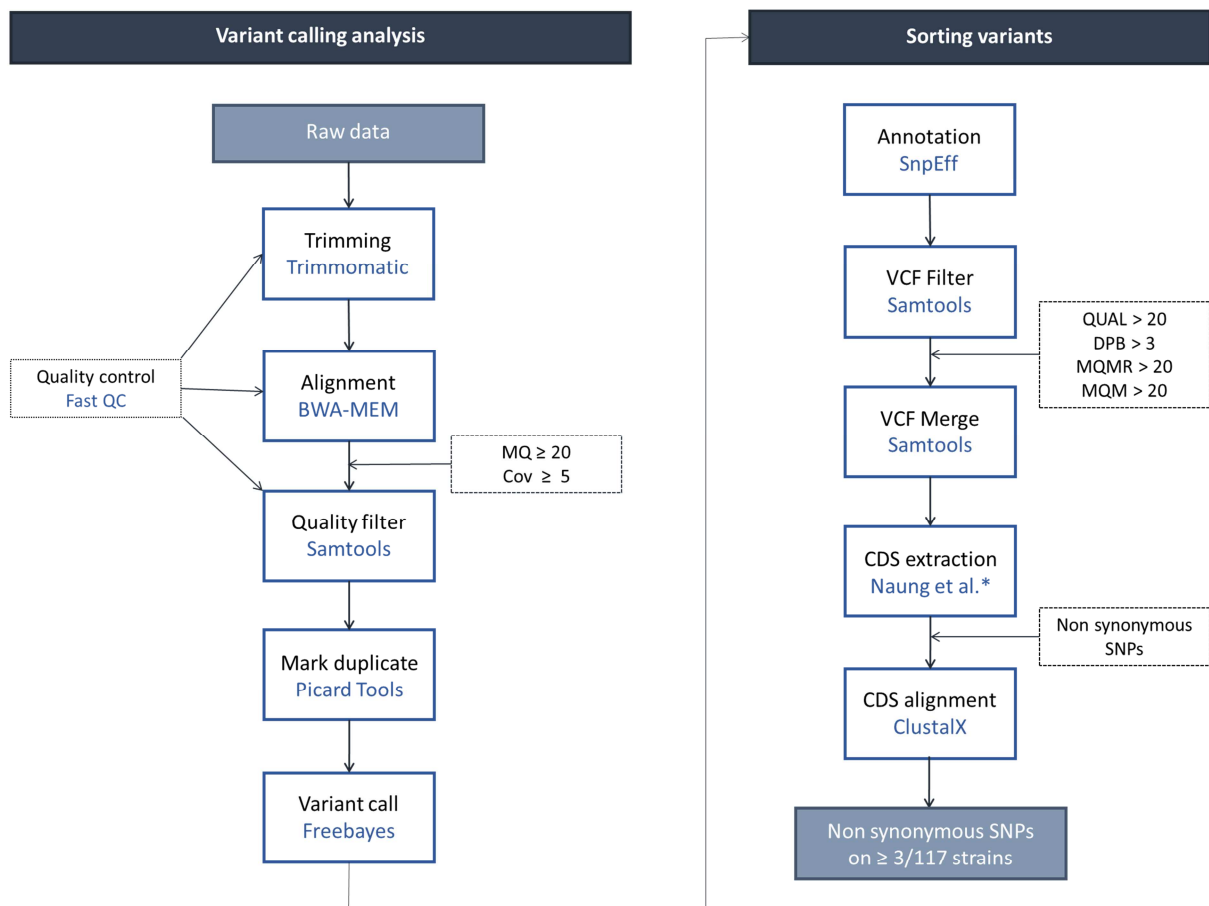


Figure S1: Variant calling analysis workflow. MQ: mapping quality. Cov: Coverage. QUAL: Quality. DPB: total read depth per bp at the locus. MQMR: mean mapping quality of observed reference alleles. MQM: mean mapping quality of observed alternate alleles. *scripts adapted from (<https://github.com/myonaung/Naung-et-al-2021>)

IV. Discussion/conclusion

Les approches non ciblées, reposant sur des études expérimentales *in vivo* mises en œuvre dans ce travail ont apporté un éclairage nouveau sur la problématique du développement de tests de sérotypage.

Tout d'abord, cette étude est la première à donner lieu à l'identification d'un panel aussi large de protéines antigéniques : plus de 700. Malgré le nombre élevé de protéines identifiées, on peut s'interroger sur l'exhaustivité de ce panel. En effet, lors de l'analyse par spectrométrie de masse certaines protéines ont été détectées avec difficulté (celles représentées par un faible nombre de peptides). Il est probable que ces difficultés soient dues au fait de la présence de ces protéines en très faible quantité dans les réactions. Il faut donc envisager la possibilité que celles présentes en trop faible quantité dans les co-IP n'aient pas pu être détectées. Parmi les 727 protéines identifiées, il est intéressant de noter que la plupart des protéines apicomplexes déjà décrites ont été retrouvées. Leur détection confirme la pertinence de leur étude dans le cadre du développement d'un test de typage. Cependant, elles ne représentent que 16 % du panel. De nombreuses autres protéines de *T. gondii* sont donc bien impliquées dans les mécanismes de la réponse immunitaire et représentent des cibles intéressantes pour de futures études sur les interactions hôte-pathogène ou même dans le cadre de développement de vaccin.

Ensuite, l'approche *in vivo* a permis de détecter la plupart des protéines pour lesquelles une spécificité de type a été identifiée dans les études précédentes. Toutefois, l'analyse bio-informatique des séquences CDS des 117 souches n'a pas retrouvé les mutations à partir desquelles cette spécificité a été décrite. Les classifications génotypiques sont en constante évolution ce qui aboutit régulièrement à des reclassements de souches dans d'autres génotypes. Les informations de polymorphisme type spécifique obtenues initialement pour ces souches reclassées sont donc maintenant obsolètes¹⁷⁴. De plus, ici, l'analyse des séquences NGS a probablement permis de

distinguer avec une meilleure fiabilité les vraies mutations des artefacts de séquençage. Cette étude a également montré que pour un locus donné, la proportion de souches mutées est faible (en moyenne 4,6 % soit 5/117 souches), que moins de 30 % des souches d'un même type présentent la mutation et que pour 90 % des locis, c'est la même mutation qui est observée sur toutes les souches mutées. Les mutations sont donc très sporadiques ce qui nécessite un grand nombre d'individus pour affirmer leur présence au sein d'un groupe. Ces différents facteurs peuvent expliquer le fait que les mutations type spécifiques précédemment décrites n'ont pas été retrouvées ici.

Enfin, les analyses *in silico* n'ont pas permis de confirmer la présence d'un polymorphisme protéique permettant de discriminer les différents génotypes et ce, malgré le nombre important de cibles identifiées, un effectif de 117 souches étudiées et l'utilisation de données NGS de bonne qualité. Dans ce travail, c'est la classification MS qui a été utilisée. Il serait intéressant d'analyser les données en regard des classifications en clade ou en génotype car celles-ci répartissent possiblement les souches différemment. Toutefois, cela aurait réduit le nombre de souches étudiées puisque sur les 117 souches, seules 54 ont un génotype RFLP « confirmé » et seules 47 peuvent être classées en clades/haplogroupe⁴⁹. La diminution de l'effectif aurait impacté les conclusions statistiques et diminué la force de l'étude. Mais compte tenu de la sporadicité des mutations, il est probable que les autres classifications ne permettent pas de relier un type à un polymorphisme.

Au final, l'étude des mutations par locus et par protéine n'a pas permis d'identifier des cibles pour le développement des tests de typage. L'intérêt de l'utilisation d'une combinaison de marqueurs ressurgit donc ici : soit par la combinaison de plusieurs peptides pour déterminer un type, soit par le design de peptides combinés. Une étude pan génomique pourrait identifier des combinaisons de mutations représentatives d'un type (étude GWAS-Genome-Wide Association Studies). Pour cela, on analyse de nombreuses variations génétiques sur une large cohorte d'individus, sans *a priori*, afin d'identifier des variations corrélées à certains traits phénotypiques. Définir un trait phénotypique s'avère compliqué sur la base de données utilisée ici. En effet, la

majorité des souches proviennent d'animaux, sans notion de leur clinique chez l'Homme. De plus, les souches humaines ont été isolées presque exclusivement chez des patients présentant des manifestations cliniques sévères, ce qui introduirait un biais dans l'étude. Il serait envisageable de faire l'analyse GWAS par rapport au génotype. Cependant, lorsqu'on s'intéresse aux 32 locis pour lesquels la proportion de souches mutées est la plus importante (plus de 75 % des souches d'un même type mutées), on montre que seule la combinaison de 8 SNPs est susceptible de discriminer les 4 types Africa 1, II, III et amazonien. Lorsqu'on combine ces 8 SNP, 10 % (10/97) des souches de type Africa1, II, III et amazoniennes sont mal classées et 45 % (9/20) des souches des types Africa 3, 4, Caribéennes, 12 et I sont mal classées. Par conséquent, il est probable qu'une analyse pangénomique, même étendue à la totalité des 986 SNPs, ne puisse pas identifier de combinaisons pour discriminer les types.

Ainsi, l'analyse des réactions de co-IP ne permet pas d'identifier de marqueurs de type, même en les combinant. La stratégie utilisant l'approche par WB qui s'est intéressée à la détermination des profils sérologiques dans leur globalité et sans *a priori* conduit à la même conclusion. L'analyse des profils WB des sérums murins montre très peu de différences entre les souches infectantes. De plus, la plupart de ces différences portent sur l'intensité des bandes observées, or l'interprétation de l'intensité des bandes en absence de témoin quantitatif est délicate. Quant aux bandes présentes uniquement sur certains profils, elles sont là aussi de faible intensité. Ces différentes observations laissent suggérer que la réponse immunitaire spécifique de type est faible et difficile à mettre en évidence dans les conditions testées. Les tests WB réalisés sur les sérums humains confortent cette hypothèse. En effet, les quelques variations observées concernent un faible nombre de bandes ou concernent l'intensité de certaines bandes. Une difficulté supplémentaire apparaît lors des tests sur sérums humains : la présence de la fixation aspécifique observée pour les sérums témoins ainsi que les variations observées lors des tests des sérums de type II avérés et présumés complique encore l'interprétation des profils. Outre le type de souche, le profil du patient : immunodéprimés, femmes enceintes ..., le stade de l'infection ou encore le taux d'Ig pourraient modifier les profils de WB. Cette

hypothèse est confortée par les études cytokiniques présentées précédemment qui montrent l'impact du terrain, des co-morbidités... dans la réponse cytokinique. Si celle-ci est sensible à ces différents facteurs, il est tout à fait envisageable que ces différents facteurs puissent impacter les profils de WB dans les conditions testées. C'est d'ailleurs pour ces raisons que nous n'avons, pour l'instant, pas envisagé d'utiliser les cytokines comme marqueurs indirect du génotype. En effet, pour obtenir des résultats fiables, il serait nécessaire de tester un grand nombre de sérums génotypés et ce pour différents contextes/co-morbidité de patients : greffés, VIH, immunocompétents, femmes enceintes

Au final, c'est la question de la pertinence des hypothèses sur lesquelles sont fondés les tests de sérotypage qui se pose. Existe-t-il une réponse anticorps spécifique de type détectable ? Existe-t-il une concordance entre génotype et sérotype ? La réponse anticorps spécifique de type semble bien exister. Au vu de nos résultats et de la littérature, il existe des variations de profils de réponse à l'infection : profils cytokiniques, profils western blot, profils de co-IP... Chez la souris hyperimmunisée, il semble y avoir une réponse différente en fonction de la souche infectante. Mais cette réponse paraît minoritaire par rapport à la réponse globale à l'infection comme en témoigne les faibles modifications d'intensité des bandes sur les WB ou la détection de protéines en faible quantité dans les réactions de co-IP. Ainsi, même si cette réponse anticorps spécifique semble présente, sa détection paraît compliquée. En outre, il faut tenir compte de la complexité des classifications génomiques, qui sans s'accorder complètement entre-elles, sont supposées concorder avec des marqueurs phénotypiques. Or, hormis GRA6 et MIC2, les principaux marqueurs génomiques utilisés pour le génotypage sont situés sur des gènes qui ne sont pas identifiés dans notre panel de candidats et/ou sur des marqueurs introniques, c'est à dire qui n'impactent pas la structure des protéines antigéniques. Ainsi, même si génotypes et virulences des souches sont liés, les classifications génomiques ne sont peut-être pas adaptées pour s'accorder à des marqueurs phénotypiques impliqués dans la réponse anticorps. La solution pourrait alors venir de la

Partie 2 : identification de marqueurs de sérotypage

détermination d'une classification sérotypique qui relierait le polymorphisme des protéines antigéniques à une expression clinique.

Conclusion

Le diagnostic biologique de la toxoplasmose bien que sensible, spécifique et basé sur des stratégies parfaitement établies, pourrait être encore amélioré. Apporter des réponses plus rapides sur le stade de l'infection ou la souche infectante serait bénéfique pour les patients. Cependant, la définition de biomarqueurs infectieux est complexe.

L'utilisation de marqueurs cytokiniques de l'infection se développe et s'étend à nombre de pathologies, infectieuses ou non. Bien que prometteuse, elle est toutefois délicate à mettre en œuvre compte-tenu de la diversité des profils cytokiniques qui, en plus d'être liés à la pathologie, dépendent aussi du fond génétique, du terrain et des comorbidités des patients. Dans le cas de la toxoplasmose, ils semblent dépendre également de nombre de facteurs supplémentaires comme la localisation clinique, le stade de l'infection et le type de la souche infectante démontrant l'importance de définir des biomarqueurs dans une population bien définie. L'étude du cytokinome réalisée ici, quoique préliminaire, montre le potentiel des cytokines dans le diagnostic du stade de l'infection chez la femme enceinte en France.

La définition de marqueurs de sérotypage s'avère, quant à elle, plus compliquée. L'utilisation d'une approche non ciblée par l'étude de l'infection *in vivo* sur un modèle murin et sur des sérums issus de patients a permis d'apporter de nouveaux éléments à la connaissance de la réponse immunitaire anti-toxoplasmique et a mis en lumière la complexité de son utilisation comme marqueur diagnostique dans le typage des souches. L'approche *in silico* a, quant à elle, montré les limites qui restreignent actuellement le développement d'une technique de sérotypage ouvrant la voie à une redéfinition du sérotypage.

Bibliographie

1. Montoya, J. G. & Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* **363**, 1965–1976 (2004).
2. Havelaar, A. H. *et al.* Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int J Food Microbiol* **156**, 231–238 (2012).
3. Mangen, M.-J. J. *et al.* Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2011. *Int J Food Microbiol* **196**, 84–93 (2015).
4. Torgerson, P. R. & Mastroiacovo, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ* **91**, 501–508 (2013).
5. Batz, M. B., Hoffmann, S. & Morris, J. G. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J Food Prot* **75**, 1278–1291 (2012).
6. Garweg, J. G., Kieffer, F., Mandelbrot, L., Peyron, F. & Wallon, M. Long-Term Outcomes in Children with Congenital Toxoplasmosis-A Systematic Review. *Pathogens* **11**, 1187 (2022).
7. Dupont, D. *et al.* Serology for Toxoplasma in Immunocompromised Patients: Still Useful? *Trends Parasitol* **37**, 205–213 (2021).
8. Villard, O. *et al.* Serological diagnosis of Toxoplasma gondii infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **84**, 22–33 (2016).
9. Robert-Gangneux, F. & Dardé, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* **25**, 264–296 (2012).
10. Xia, J. *et al.* Third-generation sequencing revises the molecular karyotype for Toxoplasma gondii and identifies emerging copy number variants in sexual recombinants. *Genome Res* **31**, 834–851 (2021).
11. Carruthers, V. B., Giddings, O. K. & Sibley, L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol* **1**, 225–235 (1999).

12. Kafsack, B. F. C. *et al.* Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* **323**, 530–533 (2009).
13. Liu, Q., Li, F.-C., Zhou, C.-X. & Zhu, X.-Q. Research advances in interactions related to *Toxoplasma gondii* microneme proteins. *Exp Parasitol* **176**, 89–98 (2017).
14. Polonais, V. *et al.* Unusual anchor of a motor complex (MyoD-MLC2) to the plasma membrane of *Toxoplasma gondii*. *Traffic* **12**, 287–300 (2011).
15. Håkansson, S., Charron, A. J. & Sibley, L. D. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J* **20**, 3132–3144 (2001).
16. Koshy, A. A. *et al.* *Toxoplasma* Co-opts Host Cells It Does Not Invade. *PLoS Pathog* **8**, e1002825 (2012).
17. Hakimi, M.-A., Olias, P. & Sibley, L. D. *Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. *Clin Microbiol Rev* **30**, 615–645 (2017).
18. Mercier, C. & Cesbron-Delauw, M.-F. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol* **31**, 60–71 (2015).
19. Attias, M. *et al.* The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors* **13**, 588 (2020).
20. Hunter, C. A. & Sibley, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* **10**, 766–778 (2012).
21. Abbas, I. E., Villena, I. & Dubey, J. P. A review on toxoplasmosis in humans and animals from Egypt. *Parasitology* **147**, 135–159 (2020).
22. Jones, J. L. & Dubey, J. P. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp Parasitol* **124**, 10–25 (2010).
23. Pappas, G., Roussos, N. & Falagas, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* **39**, 1385–1394 (2009).

24. Bóia, M. N., Carvalho-Costa, F. A., Sodré, F. C., Pinto, G. M. T. & Amendoeira, M. R. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **50**, 17–20 (2008).
25. Messier, V. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada). *Zoonoses Public Health* **56**, 188–197 (2009).
26. Bobić, B., Villena, I. & Stillwaggon, E. Prevention and mitigation of congenital toxoplasmosis. Economic costs and benefits in diverse settings. *Food and Waterborne Parasitology* **16**, e00058 (2019).
27. Robinson, E., de Valk, H., Villena, I., Le Strat, Y. & Tourdjman, M. National perinatal survey demonstrates a decreasing seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in France, 1995 to 2016: impact for screening policy. *Euro Surveill* **26**, (2021).
28. Price, C., Wilkins, P. P., Kruszon-Moran, D., Jones, J. L. & Rivera, H. N. *Toxoplasma gondii* Seroprevalence in the United States 2009–2010 and Comparison with the Past Two Decades. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **90**, 1135–1139 (2014).
29. Motoi, S. *et al.* A decreasing trend in *toxoplasma gondii* seroprevalence among pregnant women in Romania - results of a large scale study. *Exp Ther Med* (2020)
doi:10.3892/etm.2020.9012.
30. Hofhuis, A. *et al.* Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. *Epidemiol Infect* **139**, 530–538 (2011).
31. Gargaté, M. J. *et al.* *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the Portuguese population: comparison of three cross-sectional studies spanning three decades. *BMJ Open* **6**, e011648 (2016).
32. Berghold, C., Herzog, S. A., Jakse, H. & Berghold, A. Prevalence and incidence of toxoplasmosis: a retrospective analysis of mother-child examinations, Styria, Austria, 1995 to 2012. *Eurosurveillance* **21**, (2016).

33. Paris, L. Toxoplasmosis. in *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* 803–813 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-323-55512-8.00106-X.
34. Rostami, A. *et al.* Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* **26**, 673–683 (2020).
35. Wallon, M. *et al.* Congenital toxoplasma infection: monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. *Clin Infect Dis* **56**, 1223–1231 (2013).
36. Peyron, F. *et al.* Maternal and Congenital Toxoplasmosis: Diagnosis and Treatment Recommendations of a French Multidisciplinary Working Group. *Pathogens* **8**, E24 (2019).
37. Villena, I. *et al.* Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill* **15**, 19600 (2010).
38. Derouin, F., Pelloux, H., & ESCMID Study Group on Clinical Parasitology. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect* **14**, 1089–1101 (2008).
39. Aubert, D. *et al.* PCR for diagnosis and follow-up of two cases of disseminated toxoplasmosis after kidney grafting. *J Clin Microbiol* **34**, 1347 (1996).
40. Chandrasekar, P. H. & Momin, F. Disseminated toxoplasmosis in marrow recipients: a report of three cases and a review of the literature. Bone Marrow Transplant Team. *Bone Marrow Transplant* **19**, 685–689 (1997).
41. Petersen, E., Edvinsson, B., Lundgren, B., Benfield, T. & Evengård, B. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**, 401–404 (2006).
42. Kollu, V., Magalhaes-Silverman, M., Tricot, G. & Ince, D. Toxoplasma Encephalitis following Tandem Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Infect Dis* **2018**, 9409121 (2018).
43. Pereira-Chioccola, V. L., Vidal, J. E. & Su, C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol* **4**, 1363–1379 (2009).

44. Sumi, M. *et al.* Clinical characteristics and computed tomography findings of pulmonary toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* **104**, 729–740 (2016).
45. Tateno, T. *et al.* Disseminated toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation showing unusual magnetic resonance images. *Transpl Infect Dis* **19**, (2017).
46. Chehrazi-Raffle, A. *et al.* Toxoplasma gondii Serology and Outcomes After Heart Transplantation: Contention in the Literature. *Transplant Proc* **47**, 1949–1953 (2015).
47. Delair, E., Creuzet, C., Dupouy-Camet, J. & Roisin, M.-P. In vitro effect of TNF-alpha and IFN-gamma in retinal cell infection with Toxoplasma gondii. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 1754–1760 (2009).
48. Schlüter, D. *et al.* Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol* **304**, 917–929 (2014).
49. Galal, L., Hamidović, A., Dardé, M. L. & Mercier, M. Diversity of Toxoplasma gondii strains at the global level and its determinants. *Food Waterborne Parasitol. juin* **15:e00052**, (2019).
50. Lachkhem, A. *et al.* First isolation and genotyping of Toxoplasma gondii strains from domestic animals in Tunisia. *Sci Rep* **11**, (2021).
51. Dardé, M. L. Toxoplasma gondii, « new » genotypes and virulence. *Parasite Paris Fr. sept* **15**, 366–71 (2008).
52. Bertranpetit, E. *et al.* Phylogeography of Toxoplasma gondii points to a South American origin. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. mars* **48**, 150–5 (2017).
53. Saeij, J. P. J., Boyle, J. P. & Boothroyd, J. C. Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* **21**, 476–481 (2005).
54. Ajzenberg, D. *et al.* Genetic diversity, clonality and sexuality in Toxoplasma gondii. *Int J Parasitol. sept* **34**, 1185–96 (2004).

55. Lehmann, T. *et al.* Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect Genet Evol* **4**, 107–114 (2004).
56. Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R. & Dubey, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11423–11428 (2006).
57. Khan, A. *et al.* Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14872–14877 (2007).
58. Khan, A. *et al.* Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol* **41**, 645–655 (2011).
59. Su, C. *et al.* Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5844–5849 (2012).
60. Su, C., Zhang, X. & Dubey, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* **36**, 841–848 (2006).
61. Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P. & Dardé, M. L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol. déc* **48**, 4641–5 (2010).
62. Gajria, B. *et al.* ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Research* **36**, D553–D556 (2007).
63. Lorenzi, H. *et al.* Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun* (2016).
64. Fernández-Escobar, M. *et al.* *Toxoplasma gondii* Genotyping: A Closer Look Into Europe. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 842595 (2022).
65. Galal, L. *et al.* A unique *Toxoplasma gondii* haplotype accompanied the global expansion of cats. *Nat Commun* **13**, (2022).

66. Ajzenberg, D. *et al.* Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* **186**, 684–689 (2002).
67. Messaritakis, I., Detsika, M., Koliou, M., Sifakis, S. & Antoniou, M. Prevalent genotypes of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and patients from Crete and Cyprus. *Am J Trop Med Hyg* **79**, 205–209 (2008).
68. Richomme, C. *et al.* Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet Parasitol* **164**, 296–300 (2009).
69. Calero-Bernal, R. *et al.* Prevalence and genotype identification of *Toxoplasma gondii* in wild animals from southwestern Spain. *J Wildl Dis* **51**, 233–238 (2015).
70. Verma, S. K., Ajzenberg, D., Rivera-Sanchez, A., Su, C. & Dubey, J. P. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from Portugal, Austria and Israel reveals higher genetic variability within the type II lineage. *Parasitology* **142**, 948–957 (2015).
71. Klun, I. *et al.* The first isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from horses in Serbia. *Parasit Vectors* **10**, 167 (2017).
72. Dubey, J. P. *et al.* Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int J Parasitol* **41**, 1139–1147 (2011).
73. Jiang, R.-L. *et al.* Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* among Manchu pregnant women in northeastern China. *Microb Pathog* **123**, 398–401 (2018).
74. Ajzenberg, D. *et al.* Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* **199**, 1155–1167 (2009).
75. Mercier, A. *et al.* Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e876 (2010).

76. Chaichan, P. *et al.* Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infect Genet Evol* **53**, 227–238 (2017).
77. Galal, L. *et al.* *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends Parasitol* **34**, 140–154 (2018).
78. Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P. & Su, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* **38**, 561–569 (2008).
79. Mercier, A. *et al.* Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol* **11**, 1378–1387 (2011).
80. Hosseini, S. A. *et al.* Human toxoplasmosis: a systematic review for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in clinical samples. *Epidemiol Infect* **147**, e36 (2018).
81. Shwab, E. K. *et al.* Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* **141**, 453–461 (2014).
82. Sibley, L. D., Khan, A., Ajioka, J. W. & Rosenthal, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 2749–2761 (2009).
83. Gilbert, R. E. *et al.* Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* **2**, e277 (2008).
84. Vasconcelos-Santos, D. V. *et al.* Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology* **116**, 2199–2205.e1 (2009).
85. Carneiro, A. C. A. V. *et al.* Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J Clin Microbiol* **51**, 901–907 (2013).
86. Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su, C. & Jones, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* **139**, 1375–1424 (2012).

87. Rico-Torres, C. P., Vargas-Villavicencio, J. A. & Correa, D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **35**, 1079–1088 (2016).
88. Vasconcelos-Santos, D. V. Ocular manifestations of systemic disease: toxoplasmosis. *Curr Opin Ophthalmol* **23**, 543–550 (2012).
89. Ajzenberg, D. High burden of congenital toxoplasmosis in the United States: the strain hypothesis? *Clin Infect Dis* **54**, 1606–1607 (2012).
90. Fukumoto, J. *et al.* Molecular and biological analysis revealed genetic diversity and high virulence strain of *Toxoplasma gondii* in Japan. *PLoS One* **15**, e0227749 (2020).
91. Khan, I. A., Ouellette, C., Chen, K. & Moretto, M. *Toxoplasma*: Immunity and Pathogenesis. *Curr Clin Microbiol Rep* **6**, 44–50 (2019).
92. Rouatbi, M. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in North Africa: a review. *Parasite* **26**, 6 (2019).
93. Can, H. *et al.* Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of İzmir, Turkey. *PLoS One* **9**, e104930 (2014).
94. Döşkaya, M. *et al.* Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol Int* **62**, 471–474 (2013).
95. Döskaya, M. *et al.* Behaviour of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain tachyzoites during continuous production in various cell lines. *Parasitology* **132**, 315–319 (2006).
96. Şahar, E. A. *et al.* Development of a hexavalent recombinant protein vaccine adjuvanted with Montanide ISA 50 V and determination of its protective efficacy against acute toxoplasmosis. *BMC Infect Dis* **20**, 493 (2020).
97. Leroy, J. *et al.* Severe toxoplasmosis imported from tropical Africa in immunocompetent patients: A case series. *Travel Med Infect Dis* **35**, 101509 (2020).
98. Sasai, M. & Yamamoto, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Mol Med* **51**, 1–10 (2019).

99. Goldszmid, R. S. *et al.* NK cell-derived interferon- γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* **36**, 1047–1059 (2012).
100. Lutshumba, J., Ochiai, E., Sa, Q., Anand, N. & Suzuki, Y. Selective Upregulation of Transcripts for Six Molecules Related to T Cell Costimulation and Phagocyte Recruitment and Activation among 734 Immunity-Related Genes in the Brain during Perforin-Dependent, CD8+ T Cell-Mediated Elimination of *Toxoplasma gondii* Cysts. *mSystems* **5**, e00189-20 (2020).
101. Gazzinelli, R. T., Mendonça-Neto, R., Lilue, J., Howard, J. & Sher, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host Microbe* **15**, 132–138 (2014).
102. Howard, J. C., Hunn, J. P. & Steinfeldt, T. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol* **14**, 414–421 (2011).
103. Pfefferkorn, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 908–912 (1984).
104. Pittman, K. J. & Knoll, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**, 387–401 (2015).
105. Stumhofer, J. S. *et al.* Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* **7**, 937–945 (2006).
106. Sauer, A., Villard, O., Bourcier, T., Speeg-Schatz, C. & Candolfi, E. [Ocular toxoplasmosis: from pathophysiology to microbiological diagnosis]. *J Fr Ophtalmol* **36**, 76–81 (2013).
107. Guiton, R. *et al.* Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis* **202**, 427–435 (2010).

108. Kelly, M. N. *et al.* Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* **73**, 617–621 (2005).
109. Biswas, A. *et al.* Ly6C(high) monocytes control cerebral toxoplasmosis. *J Immunol* **194**, 3223–3235 (2015).
110. Khan, I. A. & Moretto, M. Immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol* **77**, 102226 (2022).
111. Arranz-Solís, D., Carvalheiro, C. G., Zhang, E. R., Grigg, M. E. & Saeij, J. P. J. *Toxoplasma* GRA Peptide-Specific Serologic Fingerprints Discriminate Among Major Strains Causing Toxoplasmosis. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, 621738 (2021).
112. Mukhopadhyay, D., Arranz-Solís, D. & Saeij, J. P. J. Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During *Toxoplasma* Infection. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 580425 (2020).
113. de Araújo, T. E. *et al.* Early serum biomarker networks in infants with distinct retinochoroidal lesion status of congenital toxoplasmosis. *Cytokine* **95**, 102–112 (2017).
114. Marino, A. P. *et al.* Circulating inflammatory mediators as biomarkers of ocular toxoplasmosis in acute and in chronic infection. *J Leukoc Biol* **108**, 1253–1264 (2020).
115. Marchioro, A. A. *et al.* Analysis of cytokines IFN- γ , TNF- α , TGF- β and nitric oxide in amniotic fluid and serum of pregnant women with toxoplasmosis in southern Brazil. *Cytokine* **106**, 35–39 (2018).
116. Pernas, L., Ramirez, R., Holmes, T. H., Montoya, J. G. & Boothroyd, J. C. Immune profiling of pregnant *Toxoplasma*-infected US and Colombia patients reveals surprising impacts of infection on peripheral blood cytokines. *J Infect Dis* **210**, 923–931 (2014).
117. de-la-Torre, A. *et al.* Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine* **68**, 23–31 (2014).

118. Mantilla-Muriel, L. E. *et al.* Serotyping, host genes and cytokines response in human ocular toxoplasmosis. *Microb Pathog* **148**, 104465 (2020).
119. Smith, J. R. *et al.* Pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Prog Retin Eye Res* **81**, 100882 (2021).
120. Raouf-Rahmati, A. *et al.* Local and systemic gene expression levels of IL-10, IL-17 and TGF- β in active ocular toxoplasmosis in humans. *Cytokine* **146**, 155643 (2021).
121. Mousa, N. M. & Jasim, H. M. Gene expression of two innate cytokines in a miscarriage toxoplasmosis woman. *Ann Parasitol* **67**, 281–286 (2021).
122. Pomares, C. & Montoya, J. G. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* **54**, 2448–2454 (2016).
123. Rey, A. *et al.* Cytokine profiling reveals decreased serum levels of CCL2 in active ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* **97**, 1338–1342 (2013).
124. de Araújo, T. E. *et al.* Putative biomarkers for early diagnosis and prognosis of congenital ocular toxoplasmosis. *Sci Rep* **10**, 16757 (2020).
125. Blader, I. J. & Saeij, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* **117**, 458–476 (2009).
126. Lourido, S., Tang, K. & Sibley, L. D. Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion. *EMBO J* **31**, 4524–4534 (2012).
127. Besteiro, S., Dubremetz, J.-F. & Lebrun, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol* **13**, 797–805 (2011).
128. Opitz, C. & Soldati, D. ‘The glideosome’: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* **45**, 597–604 (2002).
129. Gold, D. A. *et al.* The *Toxoplasma* Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. *Cell Host Microbe* **17**, 642–652 (2015).

130. Marino, N. D. *et al.* Identification of a novel protein complex essential for effector translocation across the parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **14**, e1006828 (2018).
131. Zhao, Y. O. *et al.* *Toxoplasma gondii* and the Immunity-Related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**, 234–240 (2009).
132. Kemp, L. E., Yamamoto, M. & Soldati-Favre, D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 607–631 (2013).
133. Saeij, J. P. J. *et al.* *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* **445**, 324–327 (2007).
134. Fentress, S. J. *et al.* Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* **8**, 484–495 (2010).
135. Fentress, S. J., Steinfeldt, T., Howard, J. C. & Sibley, L. D. The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* **14**, 1921–1933 (2012).
136. Steinfeldt, T. *et al.* Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol* **8**, e1000576 (2010).
137. Ma, J. S. *et al.* Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6. *J Exp Med* **211**, 2013–2032 (2014).
138. Vidal, J. E., Colombo, F. A., de Oliveira, A. C. P., Focaccia, R. & Pereira-Chioccola, V. L. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* **42**, 4765–4768 (2004).
139. La Hoz, R. M., Morris, M. I., & Infectious Diseases Community of Practice of the American Society of Transplantation. Tissue and blood protozoa including toxoplasmosis, Chagas disease, leishmaniasis, Babesia, Acanthamoeba, Balamuthia, and Naegleria in solid organ transplant

- recipients- Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant* **33**, e13546 (2019).
140. Robert-Gangneux, F. *et al.* Evaluation of Toxoplasma ELITe MGB Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* **55**, 1369–1376 (2017).
141. Garnaud, C. *et al.* Toxoplasma gondii-specific IgG avidity testing in pregnant women. *Clin Microbiol Infect* **26**, 1155–1160 (2020).
142. HAS. Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire. (2017).
143. Denis, J. *et al.* Contribution of serology in congenital toxoplasmosis diagnosis: results from a 10-year French retrospective study. *J Clin Microbiol* e0035423 (2023) doi:10.1128/jcm.00354-23.
144. Feduniw, S. *et al.* Biomarkers for Pregnancy Latency Prediction after Preterm Premature Rupture of Membranes-A Systematic Review. *Int J Mol Sci* **24**, 8027 (2023).
145. Fenton, K. A. & Pedersen, H. L. Advanced methods and novel biomarkers in autoimmune diseases - a review of the recent years progress in systemic lupus erythematosus. *Front Med (Lausanne)* **10**, 1183535 (2023).
146. Li, X.-Y., Liu, M., Fu, Y.-J., Jiang, Y.-J. & Zhang, Z.-N. Alterations in levels of cytokine following treatment to predict outcome of sepsis: A meta-analysis. *Cytokine* **161**, 156056 (2023).
147. Damiati, L. A., Denetiu, I., Bahlas, S., Damiati, S. & Pushparaj, P. N. Immunoprofiling of cytokines, chemokines, and growth factors in female patients with systemic lupus erythematosus– a pilot study. *BMC Immunol* **24**, 13 (2023).
148. Leśnik, P. *et al.* Interleukin-7 and interleukin-15 as prognostic biomarkers in sepsis and septic shock: Correlation with inflammatory markers and mortality. *Cytokine* **169**, 156277 (2023).
149. Uusitalo-Seppälä, R. *et al.* Early detection of severe sepsis in the emergency room: Diagnostic value of plasma C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **43**, 883–890 (2011).

150. Agarwal, V. Neutrophil CD64 a Diagnostic and Prognostic Marker of Sepsis in Adult Critically Ill Patients: A Brief Review. *Indian Journal of Critical Care Medicine* **24**, 1242–1250 (2020).
151. Velly, L. *et al.* Optimal combination of early biomarkers for infection and sepsis diagnosis in the emergency department: The BIPS study. *Journal of Infection* **82**, 11–21 (2021).
152. Yekani, M. & Memar, M. Y. Immunologic biomarkers for bacterial meningitis. *Clinica Chimica Acta* **548**, 117470 (2023).
153. Juillien, G. *et al.* Does serum alpha interferon measurement aid in the etiological diagnosis of febrile adult patients? *J Med Virol* **79**, 935–938 (2007).
154. Hassanshahi, F. *et al.* The Serum Level of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 and the Expression of CXCR3 of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Brucellosis Patients. *Curr Microbiol* **80**, 201 (2023).
155. Biswas, B. *et al.* IL-10/IL-6 ratio from nasal & oral swab samples, acts as an inflammatory indicator for COVID-19 patients infected with the delta variant. *Heliyon* **9**, e16985 (2023).
156. Phelippeau, M. *et al.* Changes in Inflammatory Markers in Patients Treated for Buruli Ulcer and Their Ability to Predict Paradoxical Reactions. *The Journal of Infectious Diseases* **jiad176** (2023) doi:10.1093/infdis/jiad176.
157. Sampath, P. *et al.* Plasma chemokines CXCL10 and CXCL9 as potential diagnostic markers of drug-sensitive and drug-resistant tuberculosis. *Sci Rep* **13**, 7404 (2023).
158. Martynova, E. *et al.* Differential Cytokine Responses and the Clinical Severity of Adult and Pediatric Nephropathia Epidemica. *IJMS* **24**, 7016 (2023).
159. Stins, M. F. *et al.* Elevated brain derived neurotrophic factor in plasma and interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid in meningitis compared to cerebral malaria. *Journal of the Neurological Sciences* **450**, 120663 (2023).
160. Marascio, N. *et al.* Evaluation of IL-35, as a Possible Biomarker for Follow-Up after Therapy, in Chronic Human Schistosoma Infection. *Vaccines* **11**, 995 (2023).

161. Bruschi, F., Pinto, B., Fallahi, P., Ferrari, S. M. & Antonelli, A. Increased neutrophil derived chemokines (CXCL10 and CCL2) in human trichinellosis as possible serological markers of the polarization of the immune response against the parasite. *Cytokine* **166**, 156205 (2023).
162. de-la-Torre, A. *et al.* Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2541 (2013).
163. Mammari, N., Vignoles, P., Halabi, M. A., Dardé, M.-L. & Courtioux, B. Interferon gamma effect on immune mediator production in human nerve cells infected by two strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasite* **22**, 39 (2015).
164. Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B., Suzuki, Y. & Boothroyd, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* **294**, 161–5 (2001).
165. Sousa, S. *et al.* Selection of Polymorphic Peptides from GRA6 and GRA7 Sequences of *Toxoplasma gondii* Strains To Be Used in Serotyping. *Clin Vaccine Immunol.* août **16**, 1158–69 (2009).
166. Xicoténcatl-García, L., Enriquez-Flores, S. & Correa, D. Testing New Peptides From *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA6, and GRA7 for Serotyping: Better Definition Using GRA6. *Mother/Newborns Pairs With Risk of Congenital Transmission in Mexico. Front Cell Infect Microbiol* **9**, (2019).
167. Arranz-Solís, D. *et al.* Serotyping of *Toxoplasma gondii* Infection Using Peptide Membrane Arrays. *Front Cell Infect Microbiol* **29**, (2019).
168. Sousa, S., Ajzenberg, D., Vilanova, M., Costa, J. & Dardé, M. L. Use of GRA6-Derived Synthetic Polymorphic Peptides in an Immunoenzymatic Assay To Serotype *Toxoplasma gondii* in Human Serum Samples Collected from Three Continents. *Clin Vaccine Immunol.* sept **15**, 1380–6 (2008).
169. Can, H. *et al.* Development of a new serotyping ELISA for *Toxoplasma gondii* type II, type III and Africa 1 lineages using in silico peptide discovery methods, well categorized feline and human outbreak serum samples. *BMC Infect Dis* **22**, (2022).

170. Morisset, S. *et al.* Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect* **10**, 742–747 (2008).
171. Kong, J.-T., Grigg, M. E., Uyetake, L., Parmley, S. & Boothroyd, J. C. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis* **187**, 1484–1495 (2003).
172. Xiao, J. *et al.* Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes Infect. nov* **11**, 1011–8 (2009).
173. Peyron, F. *et al.* Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect* **8**, 2333–2340 (2006).
174. Sousa, S., Fernandes, M. & Correia Da Costa, J. M. Serotyping, a challenging approach for *Toxoplasma gondii* typing. *Front. Med.* **10**, 1111509 (2023).
175. Ramus, C. *et al.* Spiked proteomic standard dataset for testing label-free quantitative software and statistical methods. *Data Brief. mars* **6**, 286–94 (2016).
176. Rozas, J. *et al.* DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol* **34**, 3299–302 (2017).

Annexes

Annexe 1 : Publication

Julie Denis, Jean-Philippe Lemoine, Coralie L'Ollivier, Anne-Sophie Deleplancque, H  l  ne Fricker Hidalgo, Hervé Pelloux, Christelle Pomares, Bernard Cimon, Luc Paris, Sandrine Houz  , Isabelle Villena, Odile Villard. Contribution of serology in congenital toxoplasmosis diagnosis: results from a 10-year French retrospective study *J Clin Microbiol.* 2023 Sep 20:e0035423. doi: 10.1128/jcm.00354-23. Online ahead of print. PMID: 37728898

Contribution of serology in congenital toxoplasmosis diagnosis: results from a 10-year French retrospective study

Julie Denis,^{1,2} Jean-Philippe Lemoine,³ Coralie L'ollivier,^{4,5,6} Anne-Sophie Deleplancque,^{4,7} H el ene Fricker Hidalgo,^{4,8} Hervé Pelloux,^{4,8} Christelle Pomares,^{4,9,10} Bernard Cimon,^{3,4,11} Luc Paris,^{4,12} Sandrine Houzé,^{4,13,14} Isabelle Villena,^{4,15,16} Odile Villard^{1,2,4}

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 9.

ABSTRACT This study aimed to evaluate different serological strategies for the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis (CT) and establish a biological algorithm for CT diagnosis. The study analyzed serological data of immunoglobulins M, A, and G (IgM, IgA, IgG) performed by immunoenzymatic and compared immunological profile (CIP) assays in 668 newborns with CT diagnosis across four testing periods: P1 (D0–D10), P2 (D11–D35), P3 (D36–D45), and P4 (>D45). Forty-nine percent of the 668 CT cases were diagnosed during P1 and 34%, 4%, and 12% during P2, P3, and P4, respectively. CIP assays detected neosynthesized IgMs/IgGs in 98% of CT cases diagnosed during P1, while IgMs and IgAs were detected in 90% and 57% of CT cases diagnosed during P2 and in 88% and 67% of diagnoses made during P3, respectively. Detection of neosynthesized IgMs/IgGs, IgMs, and IgAs by immunoassay contributed to CT diagnosis in 81%, 77%, and 60% of cases, respectively. In total, 46% of serum samples were positive for all three parameters, 27% for two, and 27% for one of the three. The study recommends using the CIP assay as standard during P1 for CT diagnosis and IgM and IgA immunoassays after P1. A clinical and biological follow-up in a specialized center with a close collaboration between biologists and clinicians is highly recommended to increase the chances of early diagnosis. Overall, this study provides useful information for the development of a biological algorithm for CT diagnosis, which can aid in early detection and appropriate treatment of this disease.

KEYWORDS congenital toxoplasmosis, serological diagnosis, immunoblot, IgM, IgA, CIP assay

Congenital toxoplasmosis (CT) is related to the transmission of *Toxoplasma gondii* to the fetus during pregnancy in cases of maternal primo infection during pregnancy (1).

Whenever there is a maternal toxoplasmic primo or an evolutive infection during pregnancy, CT must be investigated. Prenatal CT diagnosis is based on parasitic deoxyribonucleic acid detection in the amniotic fluid by using polymerase chain reaction (PCR)-based tests. Postnatal CT diagnosis can be established also by the same technique but performed on the umbilical cord blood, the newborn's peripheral blood, or the amniotic fluid collected during childbirth. To confirm the CT diagnosis in case of negative results or the absence of PCR test, serology appears as the most efficient diagnosis method. The serological work-up includes (i) testing for neosynthesized anti-*Toxoplasma* immunoglobulin IgGs (during the first 3 months) and/or IgMs (only during the first month) using compared immunological profiles (CIP) assays, (ii) testing for specific IgMs and/or IgAs using immunoanalysis, and (iii) IgG kinetics work-up (2–6). In cases of confirmed CT, it is advised to start specific treatment as soon as possible after birth (5, 7) and clinical and ophthalmological follow-up are recommended (8).

Editor Bobbi S. Pritt, Mayo Clinic Minnesota, Rochester, Minnesota, USA

Address correspondence to Julie Denis, denisj@unistra.fr.

The authors declare no conflict of interest.

Received 21 March 2023

Accepted 11 July 2023

Published 20 September 2023

Copyright   2023 Denis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#).

Our objective in this study was to evaluate the efficacy and contribution of the different serological assays to CT diagnosis during the postnatal period when the kinetics alone of IgG does not allow to confirm the diagnosis of CT and to propose standardization of the management of newborns with suspected CT.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This retrospective study analyzed 10 years' (2007–2017) worth of newborn cases presenting a postnatal CT diagnosis in 23 French University Hospitals via the TOXOSURV network set up in 2006 by the French national toxoplasmosis reference center (*Centre National de Référence—CNR Toxoplasmosis*) (9).

We collected clinical and biological data including serological results from the mothers and their infants at childbirth, as well as at different follow-up time points, along with data regarding the different serological techniques used. Serological data (IgMs/IgAs using immunoanalysis testing and neosynthesized IgMs/IgGs using CIP tests) from samples taken from birth were analyzed. Several assays were used to measure IgMs/IgAs depending on the laboratory (¹, reagents validated in newborns; ², IgM assay; ³, IgA assay): agglutination ISAGA (BioMérieux)^{1,2,3}, Platelia (BioRad)^{1,2,3}, VIDAS/VIDIA (BioMérieux)², AxSYM/Architect (Abbott)², ACCESS/DXI (Beckman Coulter)², Elecsys Cobas (Roche Diagnostic)², Liaison (Diasorin)², and Immulite (Siemens)². CIP assays were performed to detect neosynthesized IgMs/IgGs using *Toxoplasma* Western Blot IgG-IgM (LDBIO) or an enzyme-linked immuno-filtration assay technique (10).

Serological parameters studied

The efficacy of IgMs/IgAs detection assays and CIP techniques was analyzed based on the sample that led to the CT diagnosis, depending on the time period in which the analysis was performed. Four periods were defined: the P1 period (10 first days of life of the newborn), the P2 period (11th–35th day), the P3 period (36th–45th day), and the P4 period (46th–90th day).

Exclusion criteria

Analysis reports were excluded from the study when the following information was missing: age of the newborn at sampling time, type of serological assay, or in the case of incomplete serological results. Cases diagnosed antenatally were excluded. Analysis reports in which the neonatal molecular biological diagnosis was positive were also excluded if no sera were collected at the same time as initiated treatments could have interfered with the serological results (11, 12). Finally, the reports of newborns whose CT diagnosis had been established solely based on IgG kinetics using immunoenzymatic techniques were also excluded because they did not comply with the four periods defined. Finally, sera sampled after CT diagnoses were excluded from the analysis of the contribution of each parameter (positive rates and Venn analysis) regardless of the periods as antiparasitic treatment could interfere with the following serological results.

RESULTS

Study population

A total of 2,203 CT records were collected during 10 years from 27 centers (all experts in toxoplasmosis diagnosis), 1,022 of which were complete. Among these, 354 were excluded. Overall, 668 records of CT from 23 centers were analyzed, consisting of 2,525 serum samples (Fig. 1).

Serological diagnosis of CT

The serological work-up included IgM/IgA detection by immunoanalysis and investigation of any neosynthesized IgMs/IgGs using CIP assay. *Toxoplasma* testing was performed

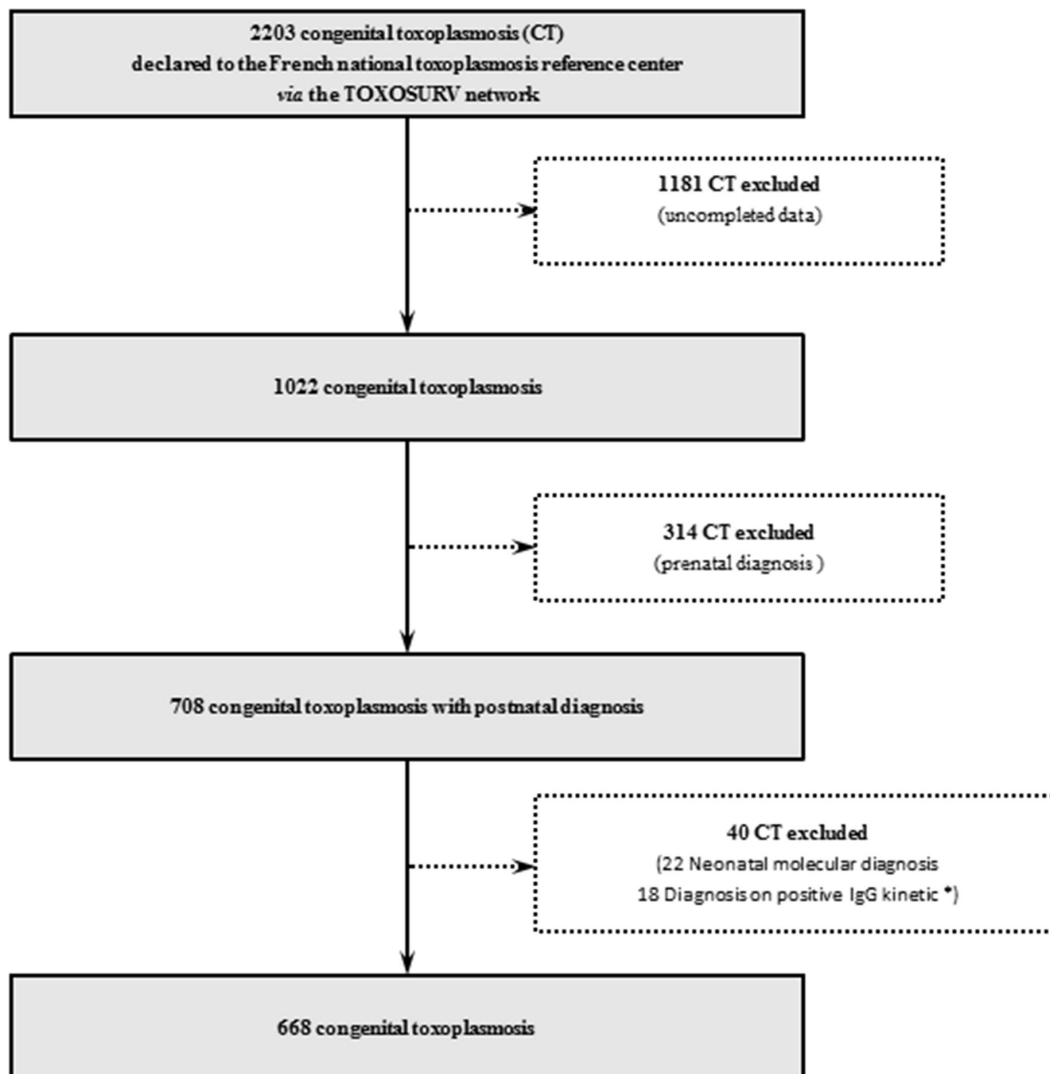


FIG 1 Study design. *We noticed 18 late CT diagnoses: 10/18 with no CIP, IgM and IgA serological monitoring according to good practice (negative serology on P1 with no control before D90), and 8/18 with a correct but negative serological follow-up.

by all centers for IgMs and by 74% of the centers for IgAs. IgM and IgA were measured on the first three samples in 98% and 88% of cases, respectively. Reagents validated for newborns were used in 87% and 70% of assays, respectively.

Our analysis of the centers' different practices demonstrated that 87% of laboratories performed CIP assays to detect neosynthesized IgMs and/or IgGs. The test was performed on the first serum sample (S1) in only 62% (414/668) of cases. Depending on the center, we noted four strategies for CIP tests realization: (i) one test performed at birth; (ii) one performed during P1 with a control test performed during P2 when necessary; (iii) one performed at birth with control tests performed during P2 and P3; (iv) only one CIP test performed during P1 or P2.

Practices analysis

On average, four serum samples (range: 1–21) were drawn from each of the 668 newborns during their follow-up. The first (S1) and second samples (S2) were taken during P1 in 87% and 61% of cases, respectively. Of note, 77% of S1 samples were

collected within the first 3 days of life. The median follow-up time between S1 and S2 was 14 days compared to 30 days between S2 and S3. We also noticed one or more control serum samples were collected in 73% of patients once the CT diagnosis was established.

CT diagnosis

CT diagnosis was established in 83% (555/668) of cases during P1 or P2 based on one of the three first serum samples taken: 48% (322/668) on S1, 27% (180/668) on S2, and 8% (53/668) on S3 (Fig. 2).

CT was diagnosed late during P4 in 12% (81/668) of cases. For 2% (16/668), S1 was taken during P4. In 10% (65/668) of newborns, S1 drawn during P1 was negative (for neosynthesized IgMs/IgGs and IgAs/IgMs detection) and the serum that led to the diagnosis was taken at P4 with a median time of 60 d after S1.

Finally, 6% (40/668) of CT diagnoses were established based on IgMs and/or IgAs detection during P1 with no serological confirmation of the positive result thereafter.

Participation of the three parameters to CT diagnosis

P1 period

CT diagnosis was established during P1 for 49% (331/668) of newborns. Over this period, 98% (325/331) of serum samples benefited from an IgM test, 71% (235/331) from an IgA test, and 89% (296/331) from a CIP test. When a CIP assay was performed, neosynthesized IgGs/IgMs were detected for 98% (291/296) of CT cases. When IgM assays were performed, results were positive in 88% (285/325) of cases, compared to 69% (163/235) of cases with positive IgA tests (Fig. 3A). In 12% (39/331) of cases, CIP assay was the only positive test. Presence of IgMs and/or IgAs led to CT diagnosis in 12% (40/331) of cases when the CIP test was negative (positive IgM and/or IgA tests confirmed during P1) (Fig. 3B).

P2 period

For 34% (230/668) of CT cases, the diagnosis was established during P2. A CIP test was performed in 43% (98/230) of cases enabling the detection of neosynthesized antibodies in 82% (80/98) of cases. T IgM and/or IgA tests were performed in 97% (223/230) and 80% (183/230) of patients, respectively, with positive results in 91% (202/223) of cases for IgMs and in 57% (105/183) for IgAs (Fig. 3A). During this period, each patient benefited from an IgM and/or IgA test with a positive result for 90% (208/230) of them. IgM and/or IgA tests allowed for 65% (150/230) of CT diagnoses during P2 in patients with a negative or absence of CIP test (Fig. 3B).

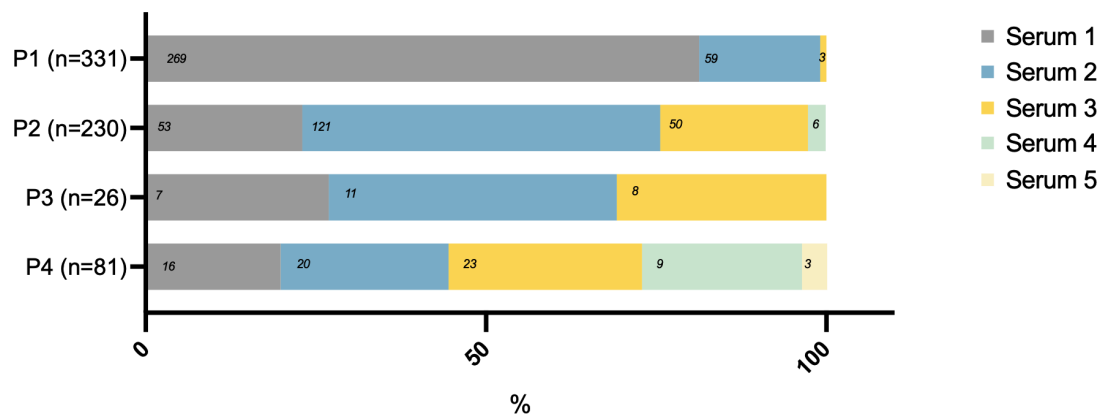


FIG 2 Categorization of the serum samples that led to CT diagnosis according to the period. CT, congenital toxoplasmosis; P, period (P1 = D0–D10; P2 = D11–D35; P3 = D36–D45; P4 = D46–D90).

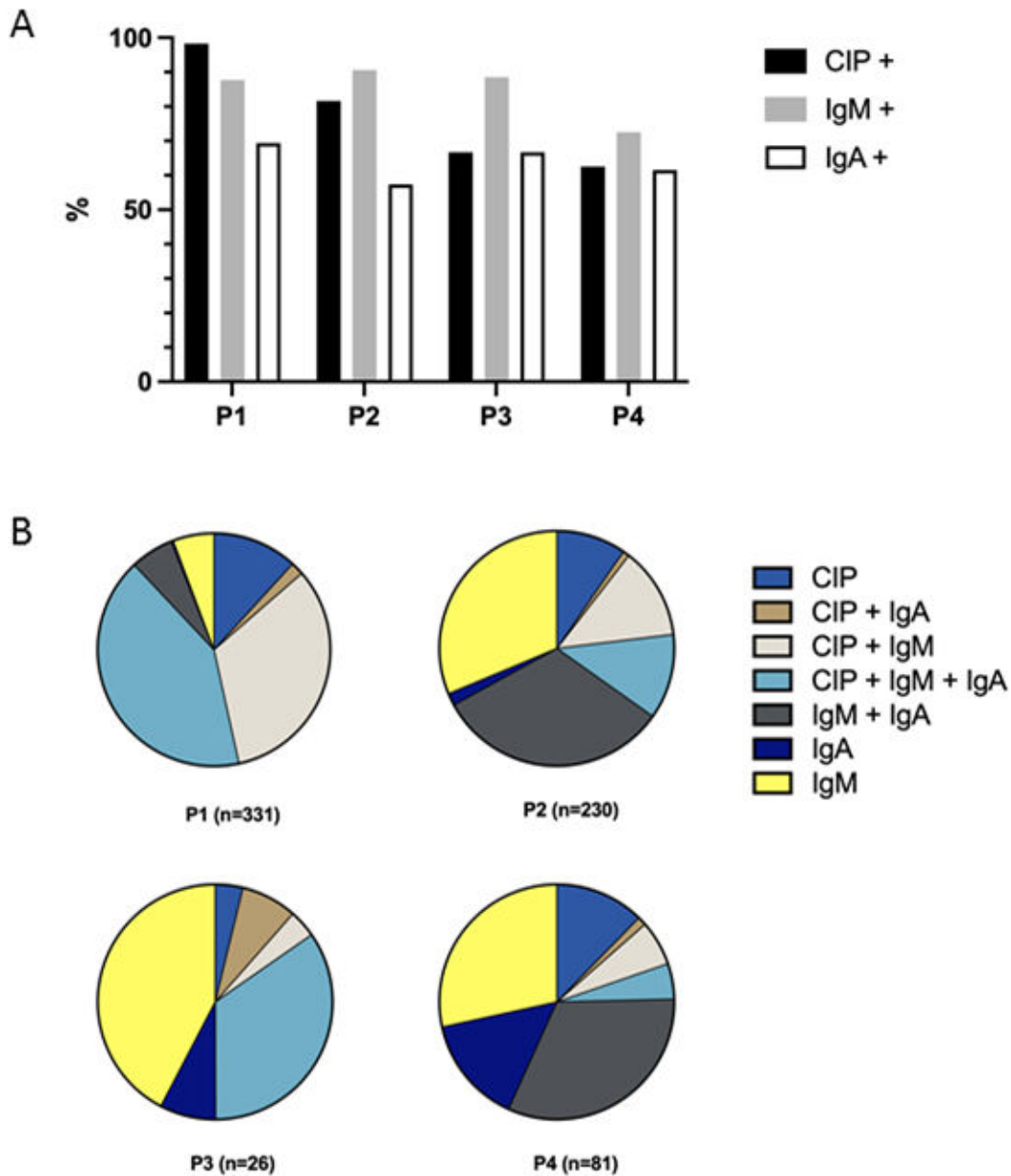


FIG 3 (A) Positivity rates of the total of compared immunological profile, IgMs, and IgA on sera that led to the CT diagnosis (positive sera/number of sera for which the technique was performed) immunoanalyses. (B) Proportions of positive techniques by combination on the sera that led to the CT diagnosis. Tests were considered positive or negative/not realized. P, period (P1 = D0–D10, $n = 331$; P2 = D11–D35, $n = 230$; P3 = D36–D45, $n = 26$; P4 = D46–D90, $n = 81$).

P3 period

During this period, 4% (26/668) of CT cases were diagnosed. All serum samples were tested for IgMs versus 81% (21/26) for IgAs and 23% (6/26) for CIP assay. IgM and IgA testing were positive in 88% (23/26) and 67% (14/21) of cases, respectively, as was CIP assay (4/6) (Fig. 3).

P4 period

During P4, 12% (81/668) of CT cases were diagnosed. IgM serological tests were performed for 99% (80/81) of patients during this period, yielding positive results in

72% (58/80) of the cases. IgA tests were performed for 80% (65/81) of patients, with a positivity rate of 62% (40/65). During P4, 40% (32/81) of serological tests included CIP assays, which had a positivity rate of 63% (20/32) (Fig. 3).

Diagnostic contribution of each assay

All three assays (CIP, IgM tests, and IgA tests) were performed in parallel on 21% (518/2,525) of the samples, representing 299 CT cases and enabling us to compare their respective contributions to the CT detection. CIP assays allowed the diagnosis in 81% (421/518), IgM tests in 77% (397/518), and IgA tests in 60% (309/518) of cases. Only 45% (235/518) of samples tested positive with all three techniques, while 27% (139/518) were positive for two (15% CIP and IgM tests, 10% IgM and IgA tests, 2% CIP and IgA tests). In 28% (144/518) of cases, only one assay was positive (19% for CIP, 6% for IgM tests, 2% for IgA tests) (Fig. 4A). During P1, all three assays were performed in 208 CT cases. CIP assays were positive for 98% (203/208) of them (Fig. 4B). For the 69 CT diagnosed during P2, CIP tests were positive for 77% (53/69) samples compared to 76% (52/69) and 54% (37/69) for IgM and IgA tests, respectively (Fig. 4C).

DISCUSSION

Follow-up frequency

Our study enabled us to show the wide variety in how different expert centers operate in terms of follow-up frequency during a newborn's first 3 months of life. Follow-up was most often structured based on the protocols established in each center. A majority of newborns (87%) were provided with at least one serological screening work-up during P1, and half of CT cases were diagnosed during this time. This early diagnosis is important because it allows for rapid treatment implementation. The sample frequency varied quite widely across the centers. Our study revealed that CT diagnosis was established during the first month of life for the majority of infants (83%), thus emphasizing how important it is to implement close neonatal and postnatal follow-ups. We also noted that 12% of CT cases were diagnosed late, i.e., during P4. For all of these cases, newborns had been lost to follow-up after being discharged and did not benefit from early serological work-up, hence the late diagnosis. By performing an initial sampling during the P1 period and a work-up during the following month, a majority of CT cases can, thus, be diagnosed. Furthermore, late diagnoses can be reduced by strengthening cohesion between laboratories, obstetric-gynecological and pediatric departments, and implementing postnatal diagnosis protocols.

Test efficacy and CT diagnostic contribution

For the centers where the CIP technique is available, this test is systematically carried out during the first month of life. However, a wide variety of strategies have been observed regarding the infant's age at the time of the first test and the frequency with which this test was performed.

CIP test greatly contributed diagnosis, providing positive results in 81% of cases and representing the only positive parameter in 19% of cases. Its value was found to be especially high during P1, with a positivity rate of 98%. When comparing infected and not infected population, previous study reported positivity rates from 33% to 79% (10, 13–15). During this period, it was the only parameter able to confirm CT diagnosis by revealing neosynthesized IgMs/IgGs (13–15). The positive immunoenzymatic tests from this period, for example, did not enable immunoglobulin originating from the mother to be distinguished from those synthesized by the newborn.

All the laboratory centers measured IgM levels and, in 87% of cases, they did so by using a technique validated for use in newborns under 1-year old (Toxo-ISAGA, BioMérieux and PlateliaTM Toxo, BioRad) (10). Performances for new CT diagnosis were identical when comparing P1 and P2 (88% and 91%, respectively). It was, on

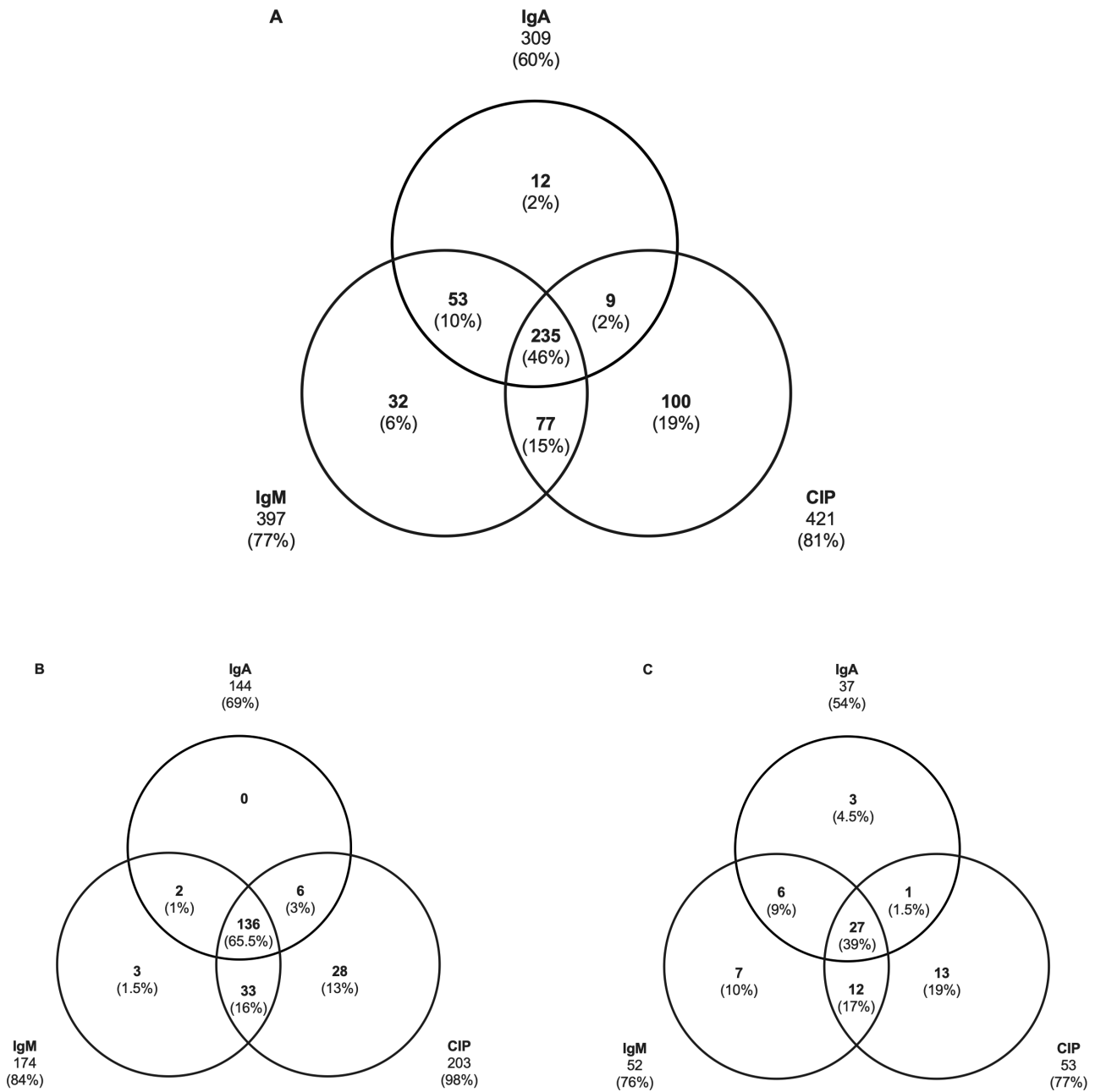


FIG 4 Venn diagram. Contributions of the CIP assays, IgM, and IgA serological tests to CT diagnosis. (A) For the four periods ($n = 299$ CT, i.e., 518 serum samples). (B) For the P1 period ($n = 208$ CT, i.e., 208 serum samples). (C) For the P2 period ($n = 69$ CT, i.e., 69 serum samples). Ig, immunoglobulin.

average, comparable to the sensitivity rates reported in previous studies that compared performances on infected and not infected populations (76.9%–100%) (10, 16, 17,18,19). Moreover, 74% of the laboratories measured IgA levels, and in 70% of cases, they used a technique that had been validated for use in newborns. Positivity rates were almost identical when comparing P1 and P2 (69% and 80%, respectively), yet poorer than the sensitivity of the IgM tests (20). Nevertheless, during P1, newborn serum can be contaminated with the mother’s serum, which could lead to false positive tests. Thus, IgM and IgA tests must be interpreted with precaution during this period.

During P2, CT diagnosis was established based on IgM and/or IgA levels in 65% of cases, highlighting the importance of these analyses during this time period. We noted

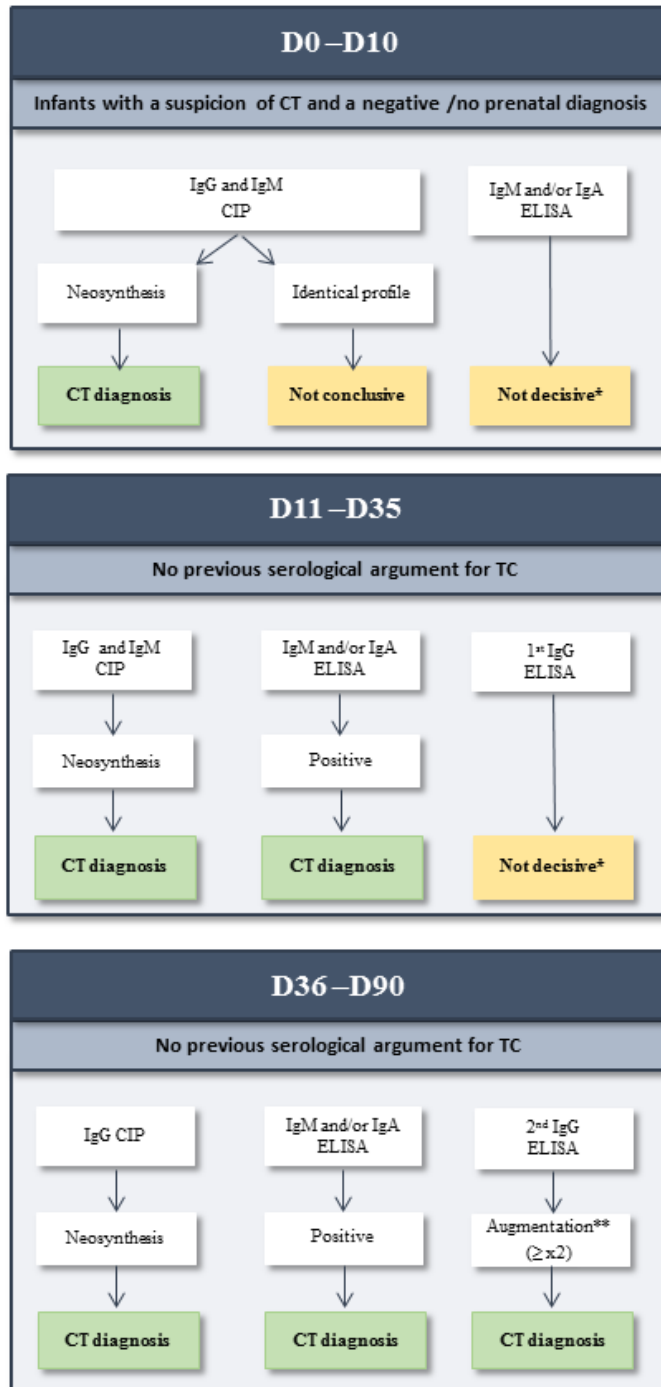


FIG 5 Recommendations from National Reference Center to CT serological diagnosis on an infant with negative or no prenatal diagnosis. *Risk of contamination by maternal immunoglobulins. **IgG must be measured in parallel on successive sera with the same technique.

the same results for P3 and P4 for patients with a correct serological follow-up (data not shown) which supports the continuation of serological screening despite several previous negative tests. In the postnatal diagnosis of CT, IgA measurement techniques were less sensitive and contributed less to CT diagnosis than IgM and CIP tests, with

rates of diagnosis contribution of 60%, 77%, and 81%, respectively (irrespective of time period). However, testing for IgAs was found to solely be positive in 2% of the samples for which the other two techniques (IgM tests and CIP) produced negative results. IgA testing can be a good complement to IgM and CIP tests, notably in cases of negative results from other work-ups (21).

We excluded 18 CT cases from the analysis due to a diagnosis made solely by IgG kinetics. For 8 of them, the serological follow-up was correct, but the tests were negative highlighting the risk of false negatives for these techniques. However, only 1–2 tests were performed on these cases, emphasizing the complementarity of these tests.

This study evaluated the contribution of the different serological parameters for CT diagnosis on infants with no positive antenatal screening. It is the first to include such a large number of CT cases allowing, thus, the determination of the most suitable paired serological parameters according to the post-natal periods. We could not evaluate formerly sensitivity and specificity as only infants with a CT diagnosis were included, yet we observed high positivity rates of each parameter. These good performances could be explained by a short exposure to maternal treatment as most infants included were contaminated during the third trimester of pregnancy. So, these results could, therefore, be particularly interesting in suspected CT when prenatal diagnosis was not performed.

Conclusion

This study enabled the CNR expert group to propose recommendations for postnatal CT diagnosis in case of negative or not performed prenatal diagnosis (Fig. 5).

Between day 0 and day 10, the CIP assay to detect IgM/IgG neosynthesis contributed the most to the CT diagnosis (98%) and should be standard for CT diagnosis. After day 10, testing for IgM and IgA is recommended and may be associated with CIP tests to detect the neosynthesis of IgMs/IgGs as well as testing for IgGs, which must be monitored monthly. Given the complexity of serological diagnosis, the expert group recommends clinical and biological follow-ups in a reference center, with collaboration between biologists, obstetricians, and pediatricians. This is of utmost importance to set up a close follow-up of the newborn whose mother seroconverted during pregnancy in order to detect and treat as soon as possible the CT.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the centers that participated in the cases collection (see collaborators).

O.V., I.V. designed the project. J.P.L. collected the data. J.D. analyzed the data and wrote the first draft of the paper, which was reviewed by all co-authors, and then revised according to their suggestions. All authors and collaborators approved the final version of the manuscript.

Maude Leveque (Montpellier), Judith Fillaux (Toulouse), Martine Wallon (Lyon), Rose Anne Lavergne (Nantes), Isabelle Accoceberry (Bordeaux), Estelle Perraud (Poitiers), Cathy Chemla (Reims), Marie-Fleur Durieux (Limoges), Julie Bonhomme (Caen), Nathalie Cabaret (Tours), JB Murat (Henri Mondor), Dorothee Quinio (Brest), Evelyne Scherer (Besançon), Nicole Desbois-Nogard (Fort de France), Anne Totet (Amiens), Hélène Yera (Cochin), Céline Nourrisson (Clermont-Ferrand), Frédéric Dalle (Dijon), Florence Robert-Gangneux (Rennes).

The authors declare that they have no conflicts of interest.

AUTHOR AFFILIATIONS

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, UR7292 Dynamique des interactions hôte pathogène, Fédération de Médecine Transrationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

³Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU d'Angers, Angers, France

⁴Centre National de Référence Toxoplasmose-Pôle sérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁵IHU-Méditerranée Infection, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France

⁶Aix Marseille University, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, IHU Méditerranée, Marseille, France

⁷CHU Lille, Parasitology Mycology Department, Lille University, Inserm, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, Lille, France

⁸Laboratory of Parasitology and Mycology, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Grenoble-Alpes University Hospital, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

⁹Parasitology-Mycology laboratory, Côte d'Azur University, INSERM 1065, Nice University Hospital, Nice, France

¹⁰Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), U1065, Université Côte d'Azur, Inserm, Nice, France

¹¹Angers University, Brest University, IRF, SFR 4208 ICAT, Angers, France

¹²Parasitology laboratory, AP-HP Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹³Parasitology laboratory, AP-HP, Hôpital Bichat - Claude Bernard, Paris, France

¹⁴University of Paris Cité, IRD 261, MERIT, Paris, France

¹⁵Department of Parasitology and Medical Mycology, National Reference Centre on Toxoplasmosis, Reims Hospital, Reims, France

¹⁶Team EA 7510, SFR CAP-SANTE, Reims Champagne Ardenne University, Reims, France

AUTHOR ORCID*s*

Julie Denis  <http://orcid.org/0009-0009-6294-9338>

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Julie Denis, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review and editing | Jean-Philippe Lemoine, Data curation | Coralie L'ollivier, Writing – review and editing | Anne-Sophie Deleplancque, Writing – review and editing | Héléne Fricker Hidalgo, Writing – review and editing | Hervé Pelloux, Writing – review and editing | Christelle Pomares, Writing – review and editing | Bernard Cimon, Writing – review and editing | Luc Paris, Writing – review and editing | Sandrine Houzé, Writing – review and editing | Isabelle Villena, Conceptualization, Writing – review and editing | Odile Villard, Conceptualization, Writing – review and editing

ETHICS APPROVAL

This study was performed under the supervision of the French National Toxoplasmosis Reference Center and benefited from agreements with the French Data Protection Agency (CNIL) and the ethics committee set up in order to implement and manage the National Reference Center on Toxoplasmosis database.

REFERENCES

- Hill D, Dubey JP. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8:634–640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- HAS. 2017. Diagnostic Biologique de la Toxoplasmose Acquise Du Sujet Immunocompétent (doNT La femme Enceinte), La Toxoplasmose Congénitale (diagnostic Pré- et postnatal) et La Toxoplasmose Oculaire
- Pomares C, Montoya JG. 2016. Laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 54:2448–2454. <https://doi.org/10.1128/JCM.00487-16>
- Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. 2016. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends Parasitol* 32:492–506. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>
- Peyron F, L'ollivier C, Mandelbrot L, Wallon M, Piarroux R, Kieffer F, Hadjadj E, Paris L, Garcia-Meric P. 2019. Maternal and congenital toxoplasmosis: diagnosis and treatment recommendations of a French multidisciplinary working group. *Pathogens* 8:24. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010024>
- Maldonado YA, Read JS, COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. 2017. Diagnosis, treatment, and prevention of congenital toxoplasmosis in the United States. *Pediatrics* 139:e20163860. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-3860>
- McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, Jalbrzikowski J, Remington J, Heydemann P, Noble AG, Mets M, Holfels E, Withers S, Latkany P, Meier P, Toxoplasmosis Study Group. 2006. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the national

- collaborative Chicago-based, congenital toxoplasmosis study. *Clin Infect Dis* 42:1383–1394. <https://doi.org/10.1086/501360>
8. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C, Peyron F. 2004. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics* 113:1567–1572. <https://doi.org/10.1542/peds.113.6.1567>
 9. 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. *Euro Surveill* 26:1900710. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.5.1900710>
 10. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, Zufferey J, Bessières M-H, Marty P, Holliman R, Johnson J, Luyasu V, Lecolier B, Guy E, Joynton DHM, Decoster A, Enders G, Pelloux H, Candolfi E. 2001. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol* 39:2267–2271. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2267-2271.2001>
 11. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. 2018. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 31:e00057-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-17>
 12. Guegan H, Stajner T, Bobic B, Press C, Olariu RT, Olson K, Srbljanovic J, Montoya JG, Djurković-Djaković O, Robert-Gangneux F. 2021. Maternal anti-*Toxoplasma* treatment during pregnancy is associated with reduced sensitivity of diagnostic tests for congenital infection in the neonate. *J Clin Microbiol* 59:e01368-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01368-20>
 13. Robert-Gangneux F, Commerce V, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. 1999. Performance of a western blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:648–654. <https://doi.org/10.1007/s100960050366>
 14. Machado AS, Andrade GMQ, Januário JN, Fernandes MD, Carneiro A, Carneiro M, Carellos EVM, Romanelli RMC, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RWA. 2010. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:757–761. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000600005>
 15. L'Ollivier C, Wallon M, Faucher B, Piarroux R, Peyron F, Franck J. 2012. Comparison of mother and child antibodies that target high-molecular-mass *Toxoplasma gondii* antigens by immunoblotting improves neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol* 19:1326–1328. <https://doi.org/10.1128/DOI.00060-12>
 16. Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, Courjault C, Séguéla JP. 2001. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 94:37–45. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(00\)00300-6](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(00)00300-6)
 17. Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG. 2011. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr Infect Dis J* 30:1056–1061. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182343096>
 18. Gilbert RE, Thalib L, Tan HK, Paul M, Wallon M, Petersen E, European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis. 2007. Screening for congenital toxoplasmosis: accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth. *J Med Screen* 14:8–13. <https://doi.org/10.1258/096914107780154440>
 19. Bessières MH, Berrebi A, Cassaing S, Fillaux J, Cambus JP, Berry A, Assouline C, Ayoubi JM, Magnaval JF. 2009. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in toulouse university hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:389–392. <https://doi.org/10.1590/s0074-0276200900200038>
 20. Murat JB, Souvignet A, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Pelloux H. 2015. Assessment of the IgA immunosorbent agglutination assay for the diagnosis of congenital toxoplasmosis on a series of 145 toxoplasmic seroconversions. *Clin Vaccine Immunol* 22:456–458. <https://doi.org/10.1128/DOI.00666-14>
 21. Wallon M, Dunn D, Slimani D, Girault V, Gay-Andrieu F, Peyron F. 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA? *Eur J Pediatr* 158:645–649. <https://doi.org/10.1007/s004310051168>

Annexe 2

Test de la technique de sérotypage décrite par *Sousa et al., 2009*

Peptides et coating : *Sousa et al., 2009*

Conditions d'ELISA :

Blocage	3% de BSA 1h
Lavage (PBST)	0.30%
Tp de dilution	PBST 0,3% + tp blocage BSA 3%
Dilution Sérums	1/50
Incubation Ac IR	2h
Dilution Ac IIR	1/5000

Résultats :

N° sérum	Type souche	IgM (UI/mL)	IgG (UI/mL)	Avidité	Clinique	DO GRA6 II	DO GRA6 I/III	DO GRA7 III	Interprétation
1	Af1	0.32 : Négatif	211 : Positif	84.1	Réactivation transplantation	0,426	1,209	0,5979	II-I/III
2	Type II	9.16 : Positive	452 : Positif	43.7	TE (TC+)	1,176	0,120	0,1661	II
3	Af2	0.16 : Négatif	376 : Positif	NR	Réactivation VIH	0,130	0,279	0,3189	II-I/III
4	Af2	0.08 : Négatif	999 : Positif	NR	Réactivation VIH	0,433	3,715	2,923	II-I/III-III
5	Af2	0.25 : Négatif	1346:Positif	NR	Réactivation VIH	0,233	2,759	3,804	II-I/III-III
6	Af2	0.25 : Négatif	1311: Positif	NR	Réactivation VIH	0,165	1,765	1,5043	II-I/III-III
7	Type II	4.83 : Positif	665 : Positif	38.4	TO	2,953	0,134	0,1303	II
8	Type II	0.16 : Négatif	4.9 : Positif	NR	Réactivation allogreffe	0,285	0,135	0,1535	II
9	Type II	0.6 : Douteux	967 : Positif	84.8	TO	0,938	0,143	0,1711	II
10	HG12	0.5 : Négatif	5.3 : Positif	NR	TO	0,155	0,135	0,1957	II
11	HG12	0.17 : Négatif	5.3 : Positif	NR	TO	0,167	0,129	0,2237	II
12	Af1	0.4 : Négatif	64.0 : Positif	NR	Réactivation VIH	0,174	3,367	0,1694	II-I/III
13	Type II	0.24 : Négatif	6.0 : Positif	NR	Réactivation allogreffe	0,2184	0,146	0,1598	II
14	Type II	0.65 : Positif	128:Positive	NR	TE (TC+)	0,2707	0,160	0,1703	II
15	Type II	0.12 : Négatif	141 : Positif	NR	Enfant TC+	0,3299	0,118	0,2927	II
16	Type II	0.05 : Négatif	183 : Positif	NR	Réactivation allogreffe	0,1392	0,315	0,1516	II-I/III
17	Af1	0.09 : Négatif	76.4 : Positif	NR	Réactivation cérébrale	0,179	1,782	0,3254	II-I/III
18	Af1	0.12 : Négatif	489 : Positif	NR	Réactivation VIH	0,826	3,321	1,8102	II-I/III-III
19	Type II	9.4 : Positif	164 : Positif	9.9	TE (TC+)	1,0108	0,184	0,1987	II

Identification de marqueurs de l'infection par *T. gondii*

L'infection à *T. gondii* est bénigne mais peut s'avérer grave et même fatale chez certains patients. Son diagnostic est sérologique et permet de préciser le stade de l'infection : évolutif (TE) ou chronique (TCh). Préciser le stade peut nécessiter des examens complémentaires ou multiples. Pour déterminer de nouveaux marqueurs du stade infectieux, nous avons exploré la dynamique d'évolution de 23 cytokines dans le sérum de femmes enceintes non infectées (NI), en phase de TE et TCh. En phase TE, la réponse Th1 est significativement augmentée et on montre une diminution rapide et significative des cytokines avec le titre des IgG. En phase de TCh, les taux de TNF- α , l'IL-17A et le CSF3 sont inférieurs à ceux des NI et TE.

T. gondii est une espèce unique qui présente une diversité de génotype en lien avec la virulence clinique. Pour développer un test indirect de typage, nous avons utilisé une approche expérimentale qui nous a permis d'identifier 727 protéines antigéniques de *T. gondii*. L'analyse du polymorphisme de ces protéines à partir de données WGS de 117 souches génotypées n'a pas permis d'identifier de mutation type spécifique permettant de discriminer les différents types de souches

Mots clés : *T. gondii*, Toxoplasmose aiguë, Toxoplasmose chronique, Cytokinome, Sérotypage

T. gondii infection is mild but can be serious and even fatal in some patients. Its diagnosis is serological and makes it possible to specify the stage of the infection: acute (TA) or chronic (TCh). Specifying the stage may require additional or multiple examinations. To determine new markers of the infectious stage, we explored the dynamics of the evolution of 23 cytokines from sera of uninfected pregnant women (NI), with acute (TA) or chronic infection (TCh). For TA, Th1 response is significantly increased and a rapid and significant decrease in cytokines correlates with IgG kinetics. For TCh, levels of TNF- α , IL-17A, and CSF3 are lower than NI and TA patients.

T. gondii is a unique species that exhibits genotype diversity related to clinical virulence. To develop an indirect typing test, we used an experimental approach that allowed us to identify 727 antigenic proteins of *T. gondii*. The analysis of the polymorphism of these proteins using WGS data from 117 genotyped strains does not allow identification of any specific type mutation making it possible to discriminate between the different types of strain

Keywords : *T. gondii*, Acute toxoplasmosis, Chronic toxoplasmosis, Cytokine, Serotyping