



Titre du sujet : *Phénomènes d'introgression dans la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* entre la région Nouvelle Aquitaine et l'Afrique de l'Ouest et Centrale : des influences humaines et environnementales.*

Financement : MESR

Nom de l'équipe et du directeur : UMR INSERM 1094 Neuroépidémiologie Tropicale – Pr Pierre-Marie PREUX

Encadrants : Thèse en co-direction Pr ML DARDE (UMR INSERM 1094 – Limoges) & Dr Aurélien MERCIER (UMR INSERM 1094 – Limoges)

Contacts : marie-laure.darde@unilim.fr / aurelien.mercier@unilim.fr

Mots clés : *Toxoplasma gondii* – diversité – introgression génomique – épidémiologie – France – Afrique

Profil et compétences recherchées : Le ou la candidat(e) doit avoir suivi un cursus universitaire dans les sciences de la vie (ex : biologie des organismes), avoir de bonnes connaissances en génétique des populations et plus largement en écologie. Des compétences en épidémiologie, parasitologie, biologie moléculaire seraient également appréciées. Il ou elle doit avoir un niveau d'anglais correct et posséder un intérêt particulier pour le milieu tropical, le travail de terrain et une curiosité pour la zoologie (comportement, diversité des espèces).

Description de la problématique de recherche : L'infection par *Toxoplasma gondii* est une zoonose ubiquitaire à l'épidémiologie complexe. Elle peut toucher l'ensemble des espèces homéothermes par plusieurs voies de transmission. La contamination s'effectue principalement par voie orale : soit par ingestion d'oocystes excrétés dans l'environnement par les félinés (hôtes définitifs), soit par consommation de tissus contaminés par des kystes. Chez l'homme, l'infection concernerait un quart de la population mondiale. Elle est généralement bénigne chez l'immunocompétent, néanmoins des formes graves, cérébrales ou viscérales, et des atteintes oculaires ont été décrites. Cette variabilité clinique serait liée à l'état immunitaire du patient, mais aussi à des déterminants génétiques de virulence de la souche responsable de l'infection. Au cours des 20 dernières années, une distribution géographique particulière de la diversité génétique dans les populations de ce parasite, dont les déterminants restent à comprendre, a été mise en évidence à travers le monde. Cette structure spatiale se caractérise par une diversité beaucoup plus importante en Amérique du Sud associée à des souches à l'origine de manifestations cliniques plus sévères voire létales en comparaison avec l'Europe et l'Amérique du Nord [1, 2, 3]. La diversité génétique du toxoplasme en Asie et en Afrique demeure très peu explorée. Cependant le peu de données disponibles sur cette parasitose en Afrique de l'Ouest et Centrale suggère une prévalence humaine et animale élevée et une sévérité inhabituelle de l'infection toxoplasmique chez l'homme [4, 5, 6]. Des études montrent une relation entre le génotype infectant et les manifestations cliniques, en particulier en Amérique du Sud [7]. Dans un monde globalisé, comprendre comment la diversité génétique du pathogène se structure et évolue s'impose comme une thématique émergente dans l'étude de l'épidémiologie de la toxoplasmose. Le rôle de facteurs anthropiques dans l'évolution de cette diversité a été montré dans le cadre de travaux de recherche préliminaires de l'équipe. Une étude menée en Guyane française [8] montre que l'anthropisation d'un milieu aboutit à une modification de la diversité génétique locale du toxoplasme. Elle met en évidence la possibilité d'introgressions de souches sauvages (plus virulentes pour l'homme) dans l'environnement anthropisé, entraînant des risques potentiels en santé humaine [3, 8]. À une échelle intercontinentale, des cas de toxoplasmose sévère, inhabituelle chez l'immunocompétent

en Europe, ont été identifiés en France métropolitaine suite à la consommation de viandes de cheval importées depuis le continent américain [9, 10]. La globalisation des échanges semble provoquer des situations à risque encore peu explorées et qui constituent des défis nouveaux en santé humaine et animale. La circulation des hôtes qu'elle soit naturelle (migration aviaire), ou anthropique (transport de produits carnés, de végétaux souillés d'oocystes, introduction d'animaux vivants tels que les chats ou les rongeurs) pourrait être source d'introduction de génotypes du toxoplasme potentiellement plus virulent et d'échanges génétiques accrus entre population d'un continent à l'autre. Ces hypothèses évoquées dans la littérature scientifique restent à démontrer.

Thématiques **Domaine** **Contexte** : Parasitologie – Travail de terrain – Épidémiologie moléculaire

Objectifs : Le projet a pour objectif général sur les trois ans à venir d'évaluer l'impact des disséminations d'origines anthropique et environnementale des souches de *T. gondii* sur sa diversité génétique et génomique dans les réservoirs animaux et leurs implications en épidémiologie humaine entre la région Nouvelle-Aquitaine et l'Afrique de l'Ouest et Centrale. La Nouvelle Aquitaine partage avec l'Afrique de l'Ouest et Centrale une longue histoire d'échanges commerciaux maritimes depuis le commerce triangulaire au travers des villes portuaires de Bordeaux et de La Rochelle jusqu'à nos jours. Par ailleurs, d'importantes voies migratoires d'oiseaux relient ces régions avec la présence en région Nouvelle Aquitaine de plusieurs sites de nidification d'oiseaux migrateurs venus d'Afrique. L'ampleur de ces échanges et la diversité des flux observés entre ces deux aires géographiques pourraient ainsi favoriser le transfert de génotypes virulents d'une région à l'autre et l'apparition de génotypes recombinants. Dans un contexte d'écologie de la santé, les objectifs spécifiques de ce projet seront : (i) la comparaison de la diversité génétique des populations de toxoplasme chez l'animal en Nouvelle-Aquitaine et en Afrique de l'Ouest (Sénégal et Bénin) et Centrale (Gabon), (ii) la mise en évidence de flux de gènes et de la reconstitution de l'histoire évolutive du toxoplasme entre ces régions d'étude, (iii) l'évaluation en modèle murin de la virulence des souches isolées et (iv) l'analyse génomique des remaniements (recombinaisons) opérés au sein des génotypes décrits en rapport avec leur expression phénotypique (virulence chez la souris).

Méthode : Les souches de toxoplasmes seront isolées dans les zones qui constitueraient des « ponts » d'échanges génétiques entre ces régions, telles que les zones portuaires actuelles et passées (comptoirs coloniaux) et les zones de regroupements d'oiseaux migrateurs. L'isolement du parasite sera réalisé à partir du cœur et/ou du cerveau d'animaux séropositifs domestiques, péri-domestiques (rongeurs) et sauvages (petits mammifères et oiseaux), prélevés de façon opportuniste. L'isolement se fera par inoculation à la souris de laboratoire du broyat des organes cibles. Des données existent déjà pour la France (CNR toxoplasmose et CRB *Toxoplasma*) et le Sénégal (travaux d'une thèse qui se termine en 2018), mais seront complétées par des échantillonnages plus spécifiques dans les zones d'intérêts. Le génotypage des souches se fera par une technique d'analyse multilocus du génome basée sur 15 marqueurs microsatellites, mise au point dans notre laboratoire et reconnue à l'international [11]. Les données de génétique des populations seront analysées de manière à estimer les flux de gènes entre les différentes régions et environnements étudiés. Une confrontation avec les données génétiques d'un grand nombre de souches du Portugal, d'Amérique du sud et des Caraïbes disponibles permettra d'évaluer l'impact de ces échanges durant l'époque moderne. Ces travaux seront réalisés à partir d'analyses phylogénétiques sur la base du génome des souches obtenues ou déjà isolées. En parallèle les génotypes obtenus seront confrontés à l'ensemble des données génétiques et cliniques collectées à travers le monde par l'équipe dont celles de patients africains du CNR toxoplasmose. Le séquençage complet [12] des souches obtenues permettra d'explorer les introgressions génomiques et leur impact sur les caractéristiques phénotypiques des souches.

Résultat attendu : Ce projet de thèse apportera des éléments utiles et indispensables à la compréhension de l'éco-épidémiologie de la toxoplasmose dans les différentes régions d'étude (prévalence, identification de réservoirs, circulation du parasite dans l'environnement, facteurs de risque). Dans la mesure du possible, ce travail tendra vers une meilleure appréciation des risques en santé humaine pour les régions d'étude, et ce par la confrontation des données collectées aux données génétiques et cliniques disponibles pour les cas de toxoplasmose chez l'homme.

Références bibliographiques :

- [1] Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. 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*. 2012;109(15):5844-9.
- [2] Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R Jr, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):942-9.
- [3] Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4037-44.
- [4] Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P, Salle B, Ajzenberg D, Dardé ML. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e876.
- [5] Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, Masters J, Parker SP, Stanford MR. Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect*. 1999;123(2):283-9.
- [6] Giroud P, Le Gac P, Gaillard JA, Roger F. Existence of toxoplasmosis as a disease of adults, whether as a febrile disease or as a boutonneuse fever type of exanthematous infection; test by inoculation of *Toxoplasma*. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1953;46:319-23.
- [7] Rudzinski M, Khoury M, Couto C, Ajzenberg D. Reactivation of ocular toxoplasmosis in non-hispanic persons, Misiones Province, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(5):912-3.
- [8] Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, de Thoisy B, Bonnabau H, Collinet F, Boukhari R, Blanchet D, Simon S, Carme B, Dardé ML. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol*. 2011;11(6):1378-87.
- [9] Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Hasseine L, Dardé ML, Marty P. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1327-8.
- [10] Aroussi A, Vignoles P, Dalmay F, Wimel L, Dardé ML, Mercier A, Ajzenberg D. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. *Parasite*. 2015;22:14.
- [11] 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*. 2010;48(12):4641-5.
- [12] Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, Karamycheva S, Pinney D, Brunk BP, Ajioka JW, Ajzenberg D, Boothroyd JC, Boyle JP, Dardé ML, Diaz-Miranda MA, Dubey JP, Fritz HM, Gennari SM, Gregory BD, Kim K, Saeij JP, Su C, White MW, Zhu XQ, Howe DK, Rosenthal BM, Grigg ME, Parkinson J, Liu L, Kissinger JC, Roos DS, Sibley LD. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun*. 2016;7:10147.



Thesis subject title: *Introgression phenomena in the study of genetic diversity of *Toxoplasma gondii* between Nouvelle Aquitaine region (France) and West and Central Africa: possible environmental and human influences.*

Financing : région

Team's/Director's names: UMR INSERM 1094 Neuroépidémiologie Tropicale / Pr Preux

Precision on the supervision (name of the supervisor(s)): Thesis in co-direction Dr A Mercier (UMR INSERM 1094 – Limoges) & Pr ML Dardé (UMR INSERM 1094 – Limoges)

Keywords: *Toxoplasma gondii* – diversity – genomic introgression – molecular epidemiology– France – Africa

Profile and skills required: The candidate must have an academic background in life sciences (eg biology of organisms), have a good knowledge of population genetics and more largely in ecology. Expertise in epidemiology, parasitology, and molecular biology would also be appreciated. He or she must have a correct level of English and have a particular interest in the tropical environment, fieldwork and curiosity for zoology (animal behavior, species diversity).

Description of the research subject: *Toxoplasma gondii* infection is a ubiquitous zoonosis that affects all warm-blooded species. It has a complex epidemiology due to the wide range of hosts and transmission pathways involved. Contamination occurs mainly by oral route: by ingestion of oocysts shed in the environment by felids (final hosts) or by consumption of cysts-contaminated tissues. In human, it is estimated that one quarter of the human population is infected. Although it is generally benign in immunocompetent persons, life-threatening cerebral and multivisceral forms, in addition to ocular forms, have been described. This clinical variability seems to be related to the patient's immune status, but also to the virulence genetic determinants of the parasite strain. Over the last twenty years, a highly contrasted geographic distribution of the parasite populations in terms of genetic diversity has been demonstrated around the world. Determinants of this spatial structure are still poorly understood. In comparison to Europe and North America, a huge genetic diversity was found in South America, with highly pathogenic and even life-threatening strains described [1, 2, 3]. Limited data is available about genetic diversity in Asia and Africa. However, the few studies conducted in Africa give insights of a high prevalence in human and animals, with an unusual severity of the human infection [4]: incidence of ocular toxoplasmosis in patients born in West Africa was 100 times higher than in patients born in Great-Britain irrespective of their ethnic origins [5]; severe clinical forms among immunocompetent patients have also been reported in Africa [6]. A number of studies showed a link between the clinical expression and the causal strain, especially in South America [7]. In a globalized world, understanding how the genetic diversity of the pathogen is structured becomes an emerging theme in the study of the toxoplasmosis epidemiology. It is an important public health issue and a priority to consider controlling this major parasitosis. Preliminary studies conducted by our team showed the role of human factors in the evolution of this diversity. A study conducted in French Guiana [8] shows that the environment anthropization results in changes in the parasite's local genetic diversity. It highlights the possibility of introgressions of wild strains (more genetically diverse and virulent for humans than anthropized strains) in the anthropized environment, causing potential risks for human health [3, 8]. These introgressions could favor the appearance of virulent recombinants. On a global scale, cases of severe toxoplasmosis, unusual among immunocompetent patients in Europe, were identified in metropolitan France following the consumption of horsemeat imported from the

American continent [9, 10]. Trade globalization seems to create risk situations that are still unexplored and represent new challenges in human and animal health. The circulation of hosts, whether natural (bird migrations) or anthropogenic (transport of meat products, plants contaminated with oocysts, introduction of live animals such as cats or rodents) could be a source of introgression of *T. gondii* genotypes from one continent to another. These hypotheses suggested in the scientific literature remain to be demonstrated.

Thematic Area Context: Parasitology – Field work in tropical and temperate areas – Molecular epidemiology

Objectives: The aim of the IntroTox project is to assess the impact of human and environmental disseminations of *T. gondii* strains on its genetic and genomic diversity among the animal reservoirs and their implications in human epidemiology between Nouvelle Aquitaine region and West and Central Africa. These regions share a long history of commercial exchanges since the triangular trade period and important bird migratory corridors connect them. The extent of these exchanges and the diversity of flows observed between these two regions could thus favor the transfer of virulent genotypes from one region to another and the appearance of recombinant genotypes. In the context of health ecology, the specific objectives of this project will be: (i) to compare the genetic diversity of *T. gondii* populations in animals from France and West (Senegal and Benin) and Central (Gabon) Africa, (ii) to demonstrate gene flows and reconstruct the evolutionary history of *T. gondii* between these regions, (iii) to evaluate the virulence of isolated strains and (iv) to analyse genomic rearrangements (recombinations) within described genotypes in relation to their phenotypic expression (virulence in mice).

Methodology: *T. gondii* strains will be isolated in areas that could be "bridges" of genetic exchange between these regions, such as present and past (colonial period) port areas¹ and migratory birds gathering areas². Isolation of the parasite will be carried out from hearts and / or brains of domestic, peridomestic (rodent) and wild (small mammals and birds) seropositive animals, harvested opportunistically. Isolation will be done by inoculation of the parasite's tropism organs to laboratory mice. Data already exist for France (National Reference Center for Toxoplasmosis -CNR- and Center for *Toxoplasma* Biological Resources -CRB-) and Senegal (work of a thesis which ends in 2018), but will be supplemented by more specific sampling in areas of interest. Genotyping of the strains (or direct DNA) will be done by a multilocus analysis technique based on 15 microsatellite markers, developed in our laboratory and internationally recognized [11]. Population genetics analysis will be helpful to estimate gene flows between the different regions and environments studied. These gene flows will be considered in the light of available data on bird migration and the history of maritime traffic linking France to its former colonies in Sub-Saharan Africa since triangular trade to the present day (history, intensity and nature of trade). A comparison with the genetic data of a large number of strains from Portugal, South America and the Caribbean available at the CNR/CRB, will allow to evaluate the impact of these exchanges during the modern period on populations of *T. gondii*. This work will be carried out using genome-based phylogenetic analyzes of the strains obtained or already isolated. The virulence of the strains obtained will be characterized in mice during isolation by taking into account the dose-effect relationship of the inoculum by quantitative PCR. In parallel, the genotypes obtained will be confronted with all the genetic and clinical data collected throughout the world by our team, including strains isolated in patients from Africa through the CNR activities. The full sequencing of the obtained strains will allow demonstrating possible genomic introgressions and their impact on the phenotypic characteristics of the strains [12].

Expected results: This thesis project will provide useful data for the understanding of toxoplasmosis eco-epidemiology in different study areas (prevalence, identification of reservoirs, circulation of the parasite in the environment, risk factors). As far as possible, this work will tend towards a better appreciation of the risks for human health in the study regions, by comparing the collected data with the genetic and clinical data available for toxoplasmosis cases in humans. Ultimately, this thesis will contribute to the provision of data for risk assessment in human and animal health related to the genetic diversity of this parasite. It will allow the identification of entry routes and zones or

environments favorable for the emergence of new genotypes in Nouvelle-Aquitaine region, thus generating knowledge in areas of research that have not yet been explored.

References:

- [1] Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. 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*. 2012;109(15):5844-9.
- [2] Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R Jr, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):942-9.
- [3] Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4037-44.
- [4] Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P, Salle B, Ajzenberg D, Dardé ML. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e876.
- [5] Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, Masters J, Parker SP, Stanford MR. Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect*. 1999;123(2):283-9.
- [6] Giroud P, Le Gac P, Gaillard JA, Roger F. [Existence of toxoplasmosis as a disease of adults, whether as a febrile disease or as a boutonneuse fever type of exanthematous infection; test by inoculation of *Toxoplasma*]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1953;46(3):319-23.
- [7] Rudzinski M, Khoury M, Couto C, Ajzenberg D. Reactivation of ocular toxoplasmosis in non-hispanic persons, Misiones Province, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(5):912-3.
- [8] Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, de Thoisy B, Bonnabau H, Collinet F, Boukhari R, Blanchet D, Simon S, Carme B, Dardé ML. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol*. 2011;11(6):1378-87.
- [9] Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Hasseine L, Dardé ML, Marty P. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1327-8.
- [10] Aroussi A, Vignoles P, Dalmay F, Wimel L, Dardé ML, Mercier A, Ajzenberg D. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. *Parasite*. 2015;22:14.
- [11] 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*. 2010;48(12):4641-5.
- [12] Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, Karamycheva S, Pinney D, Brunk BP, Ajioka JW, Ajzenberg D, Boothroyd JC, Boyle JP, Dardé ML, Diaz-Miranda MA, Dubey JP, Fritz HM, Gennari SM, Gregory BD, Kim K, Saeij JP, Su C, White MW, Zhu XQ, Howe DK, Rosenthal BM, Grigg ME, Parkinson J, Liu L, Kissinger JC, Roos DS, Sibley LD. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun*. 2016;7:10147.