



JOURNÉES RONGEURS CBGP 2019

Diversité génétique de *Toxoplasma gondii* en Afrique de l'Ouest : *bilan de mission au Bénin, influence du commerce maritime et perspectives de travail*

Azra HAMIDOVIĆ

UMR INSERM 1094 NET

Université de Limoges



Inserm



**Université
de Limoges**

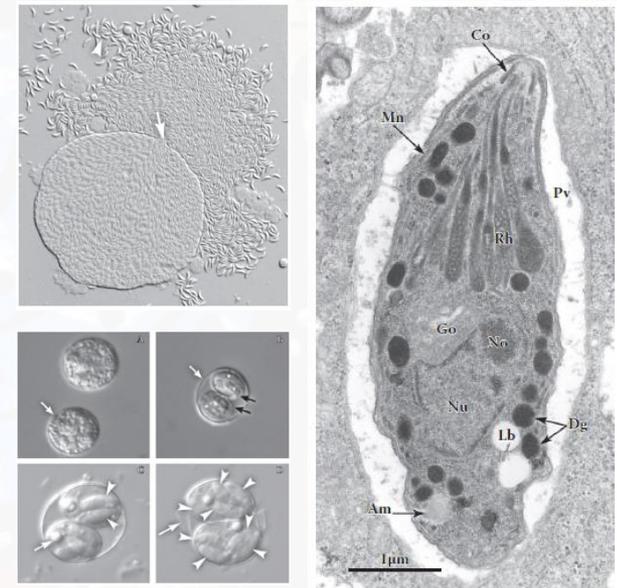
Directeurs de thèse :
Pr. Marie-Laure DARDÉ
Dr. Aurélien MERCIER

1^{er} octobre 2019

Toxoplasma gondii : présentation

Toxoplasma gondii

- **Parasite apicomplexe** de la famille des Coccidiae
- **Intracellulaire obligatoire**
- Cycle chez une grande variété d'hôtes homéothermes



(Dubey, 2009)

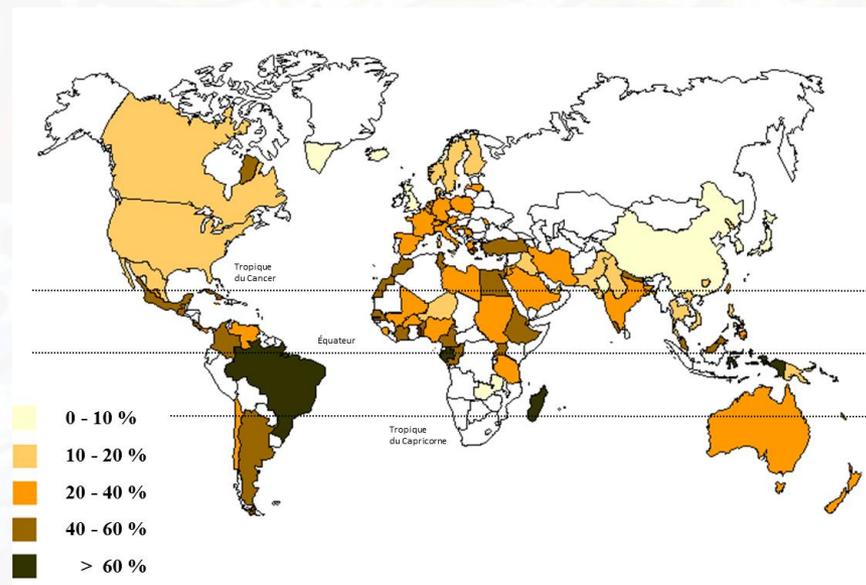
Toxoplasma gondii : présentation

Toxoplasma gondii

- **Parasite apicomplexe** de la famille des Coccidiae
- **Intracellulaire obligatoire**
- Cycle chez une grande variété d'hôtes homéothermes

Toxoplasmose

- **Zoonose**
- 25% de la population mondiale infectée



(Mercier, non publié)

Toxoplasma gondii : présentation

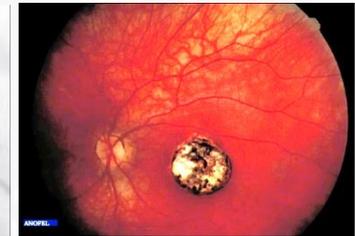
Toxoplasma gondii

- **Parasite apicomplexe** de la famille des Coccidiae
- **Intracellulaire obligatoire**
- Cycle chez une grande variété d'hôtes homéothermes

Toxoplasmose

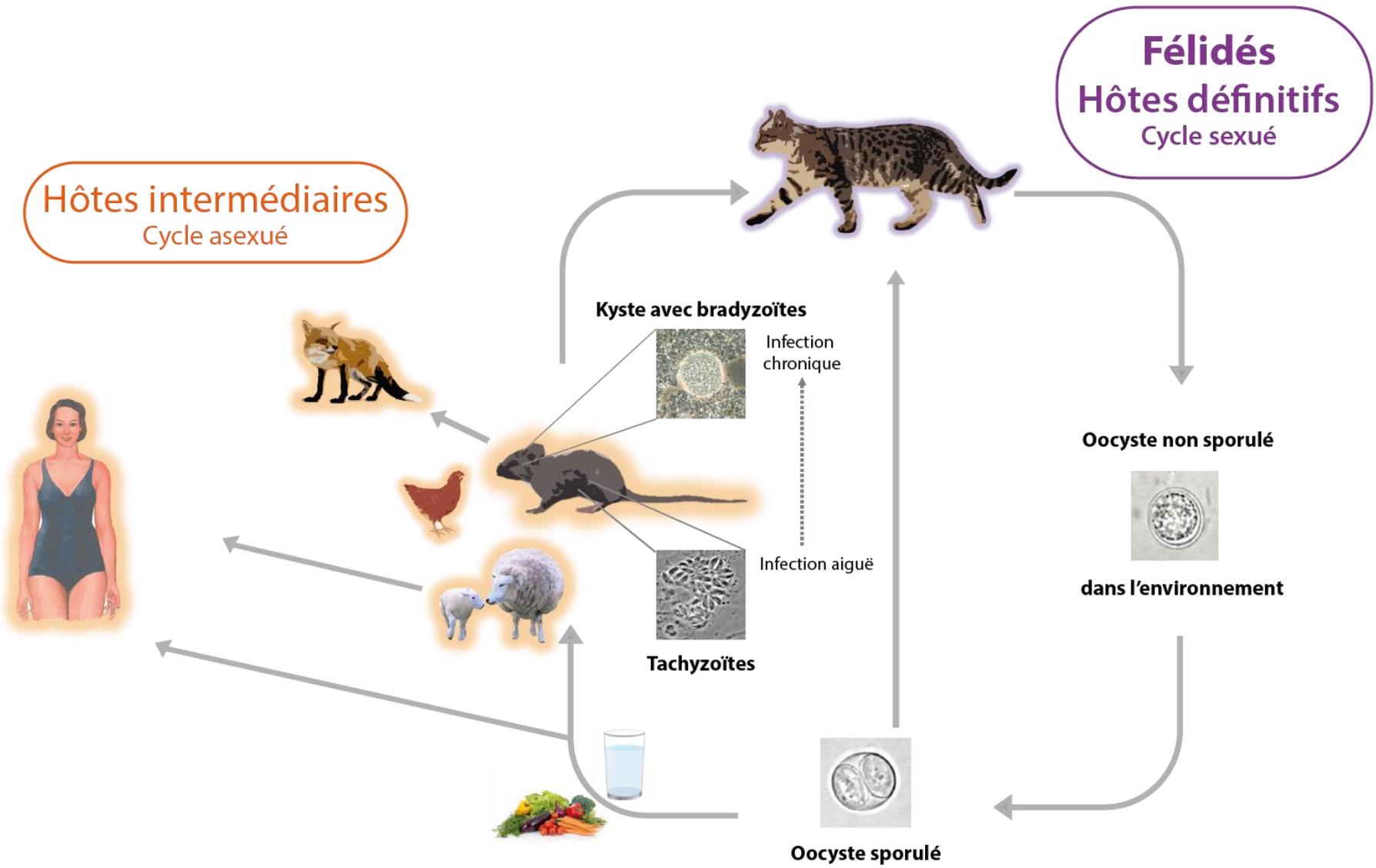
- **Zoonose**
- 25% de la population mondiale infectée
- **Généralement asymptomatique**
- Forme aiguë potentiellement **grave** quand :
 - Atteinte **congénitale** chez le fœtus
 - **Immunosuppression** → séroconversion ou réactivation

→ **Lien possible avec le génotype de *T. gondii***



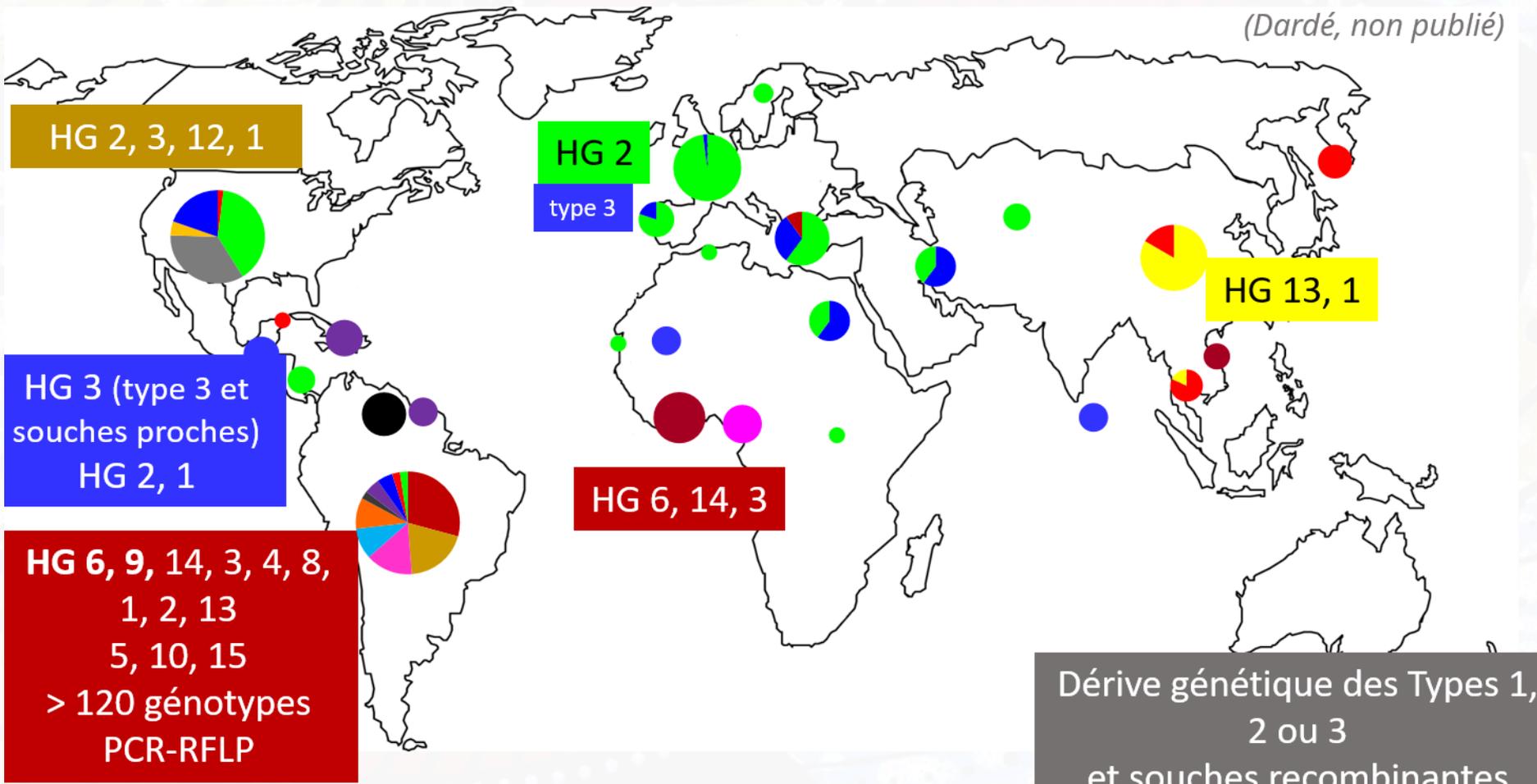
(Dubey, 2009; ANOFEL)

Cycle complexe de *T. gondii*



Distribution des haplogroupes de *T. gondii*

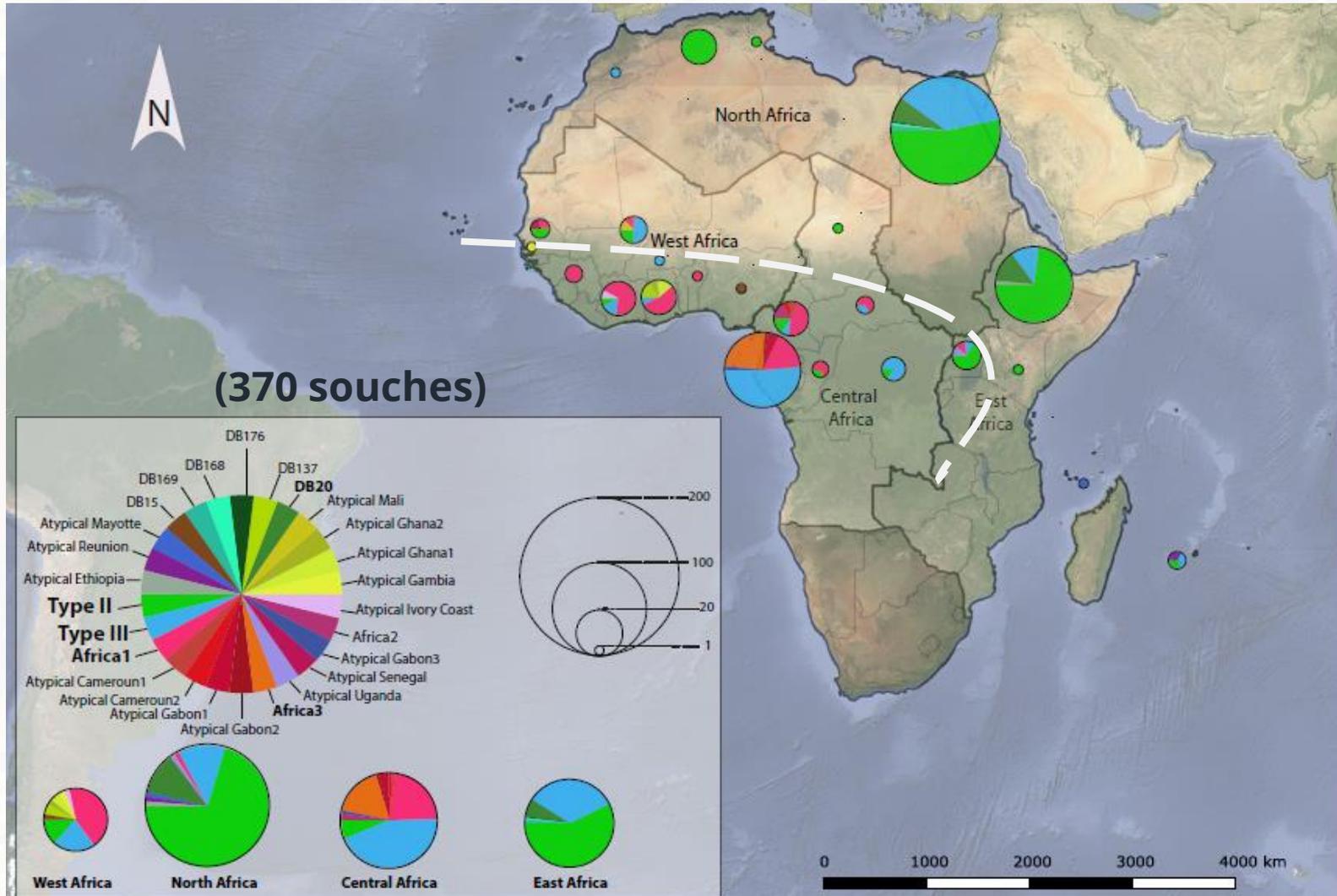
(Dardé, non publié)



- HG 3 (Type III)
- HG 2 (type II)
- HG 1 (type I)
- HG 14 (Africa 3)
- HG 4 (BrII, BrIV)
- HG 8
- HG 3 (Caribbean)
- HG 12 (type 12, X)
- HG 6 (Africa 1, BrI)
- Amazonien (HG 5-10)
- HG 13 (Chinese 1)
- HG 9 (BrIII)

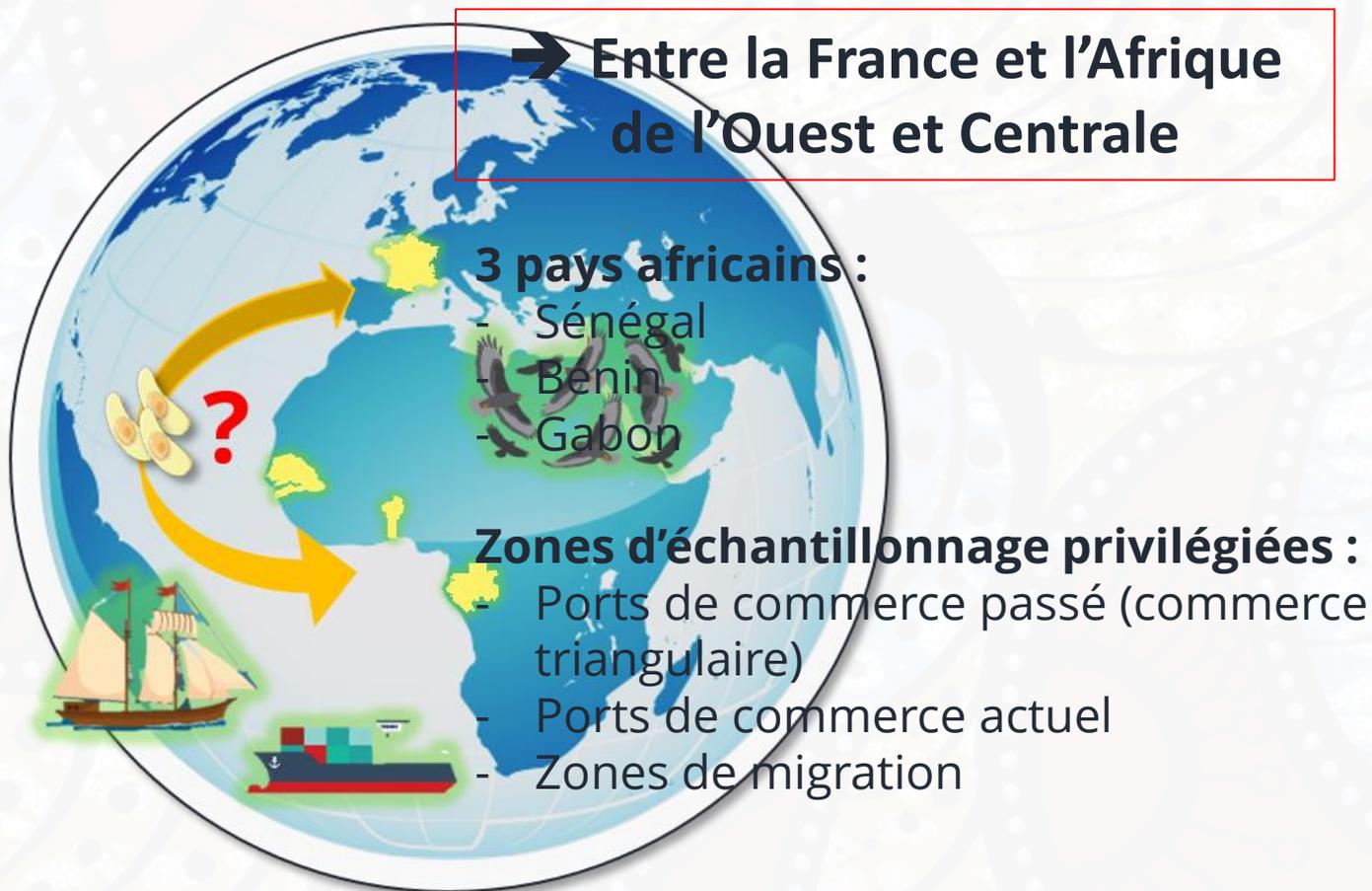
Le toxoplasme en Afrique

- **Afrique** = une des régions du monde les **moins étudiées** concernant le toxoplasme

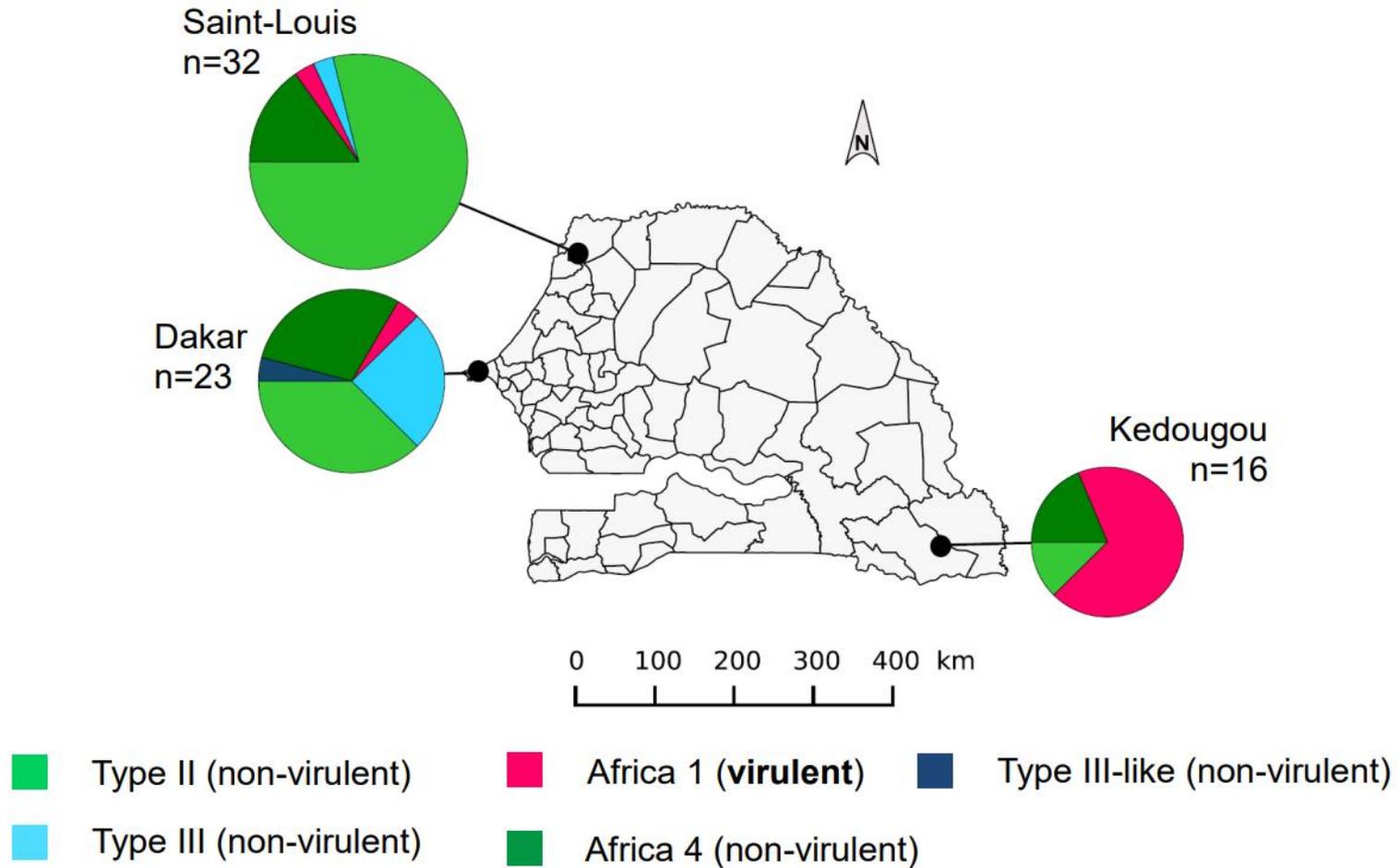


(Galal et al., 2017)

Objectif principal : étudier l'**influence humaine** sous diverses formes (**commerce maritime** etc.) et **environnementale** (**oiseaux migrateurs** etc.) sur la **structuration des populations du toxoplasme** et leur **impact sur son épidémiologie**

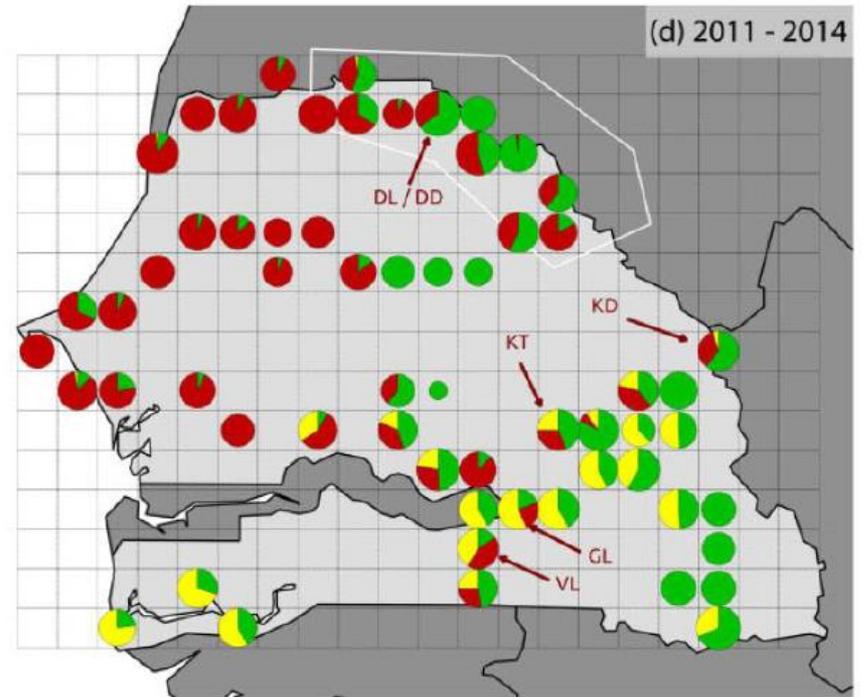
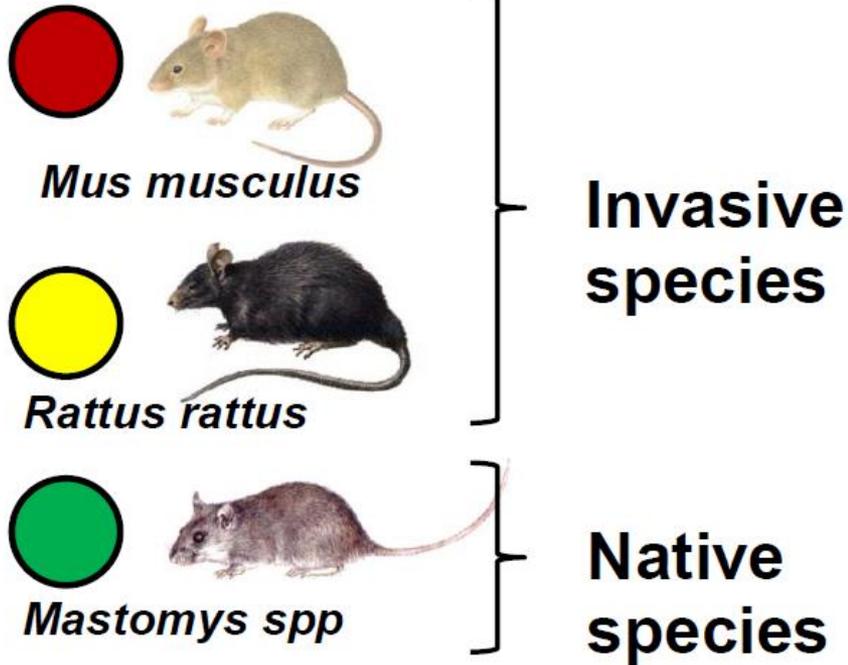


Les génotypes de *Toxoplasma gondii* au Sénégal



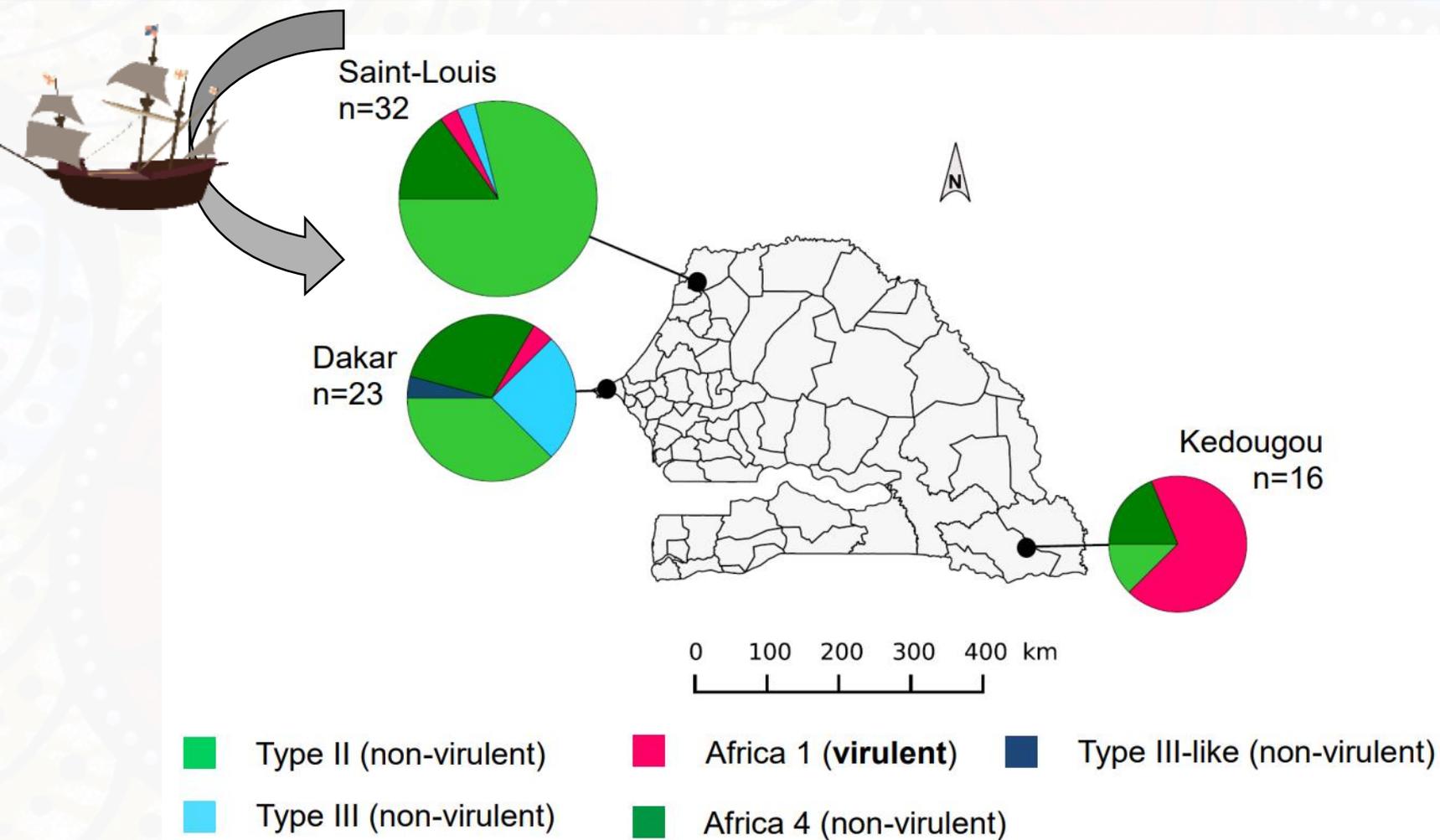
(Galal et al., 2019)

Les génotypes de *Toxoplasma gondii* au Sénégal



(Dalecky et al., 2015)

Les génotypes de *Toxoplasma gondii* au Sénégal



(Galal et al., 2019)

Objectif principal : étudier l'**influence humaine** sous diverses formes (**commerce maritime** etc.) et **environnementale** (**oiseaux migrateurs** etc.) sur la **structuration des populations du toxoplasme** et leur **impact sur son épidémiologie**

Objectifs spécifiques :

- Caractériser les **possibilités d'introgression** de génotypes d'une origine géographique à l'autre
 - 1) Isolement du parasite à partir des réservoirs
 - 2) Caractérisation des génotypes des parasites isolés
- Analyser les **échanges génétiques** et la persistance de certains gènes dans ces zones
Données microsatellites / Séquençage / NGS
- Caractériser la virulence des souches à l'isolement



Objectifs de ma thèse

Objectif principal : étudier l'influence humaine sous différentes formes (**commerce maritime** etc.) et **environnementale** (oiseaux migrateurs) sur la **structuration des populations du toxoplasme** et leur **impact** sur la santé humaine.



...sion de génotypes

...olés

...persistance de

...souches à l'isolement

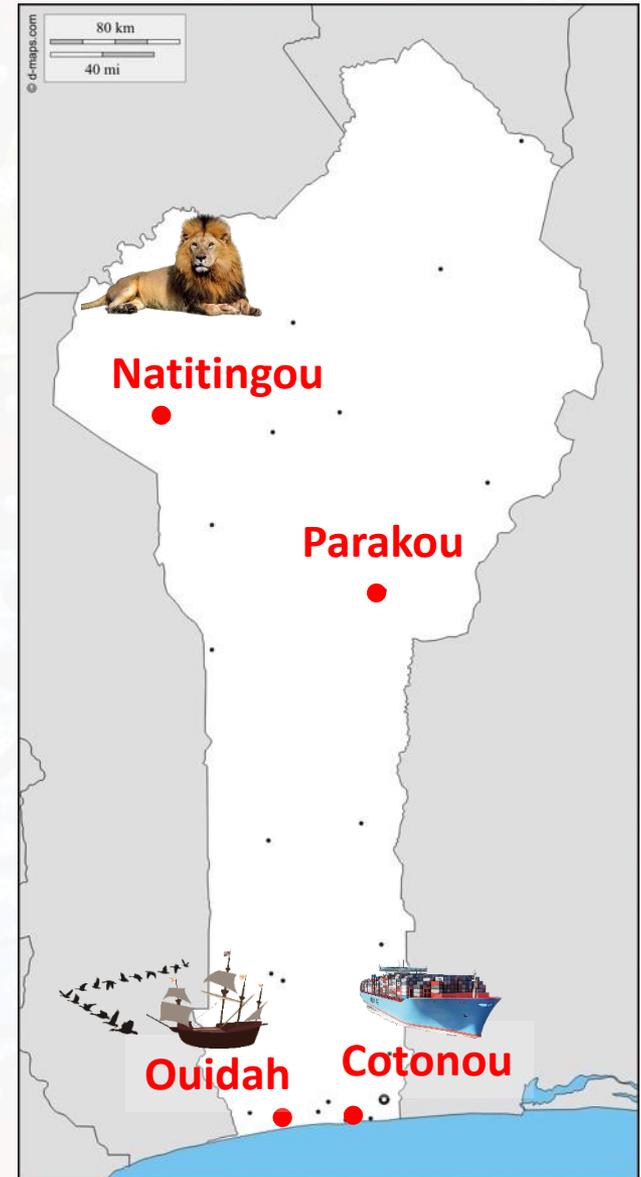
Mission au Bénin



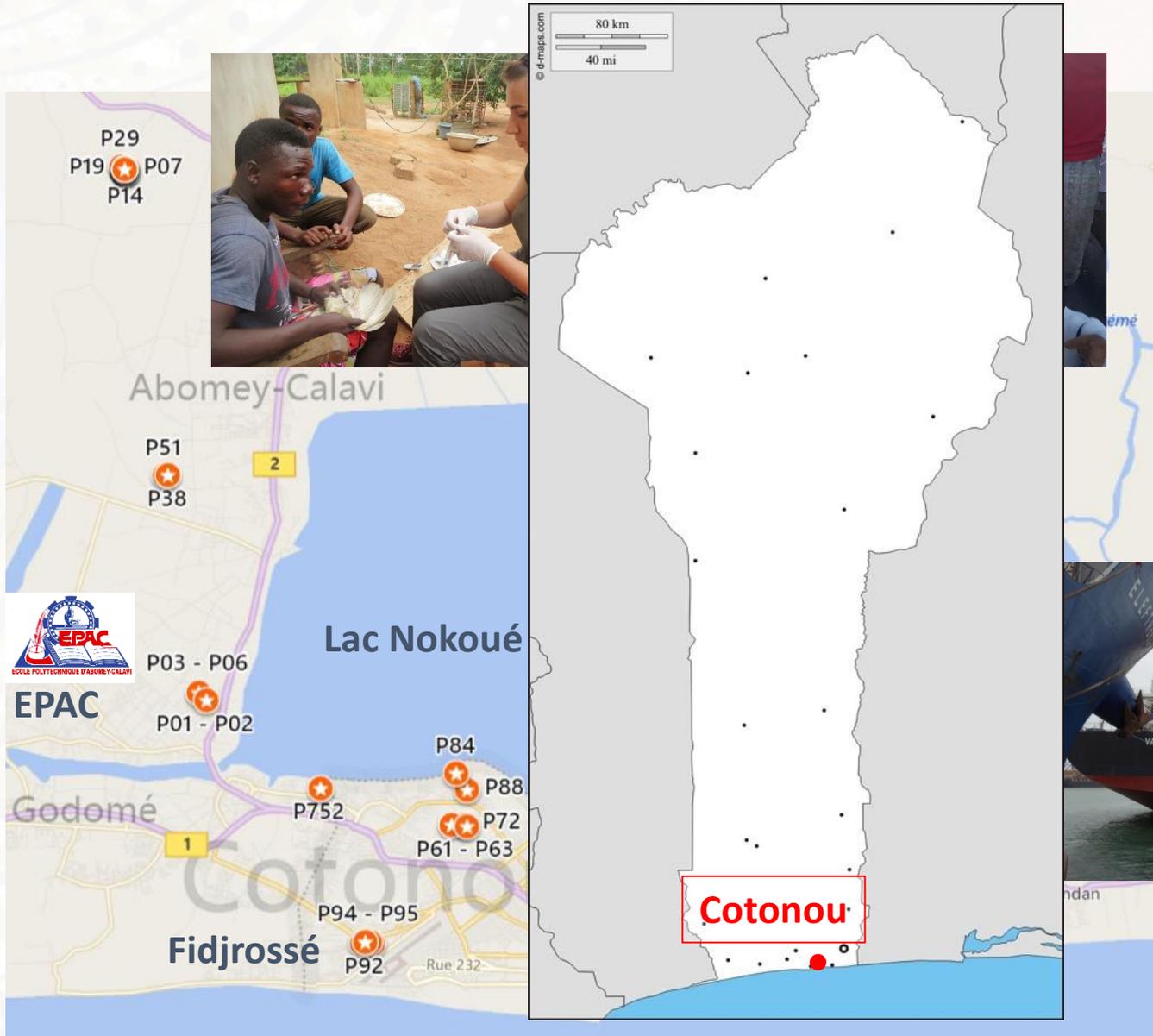
6 mois : du 1^{er} mai au 1^{er} novembre 2018

4 sites d'échantillonnage

- Cotonou du 29/05 au 05/06 + 24/09 au 27/09
- Ouidah du 28/06 au 08/07
- Parakou du 01/08 au 12/08
- Natitingou du 06/09 au 17/09



Mission au Bénin / Cotonou



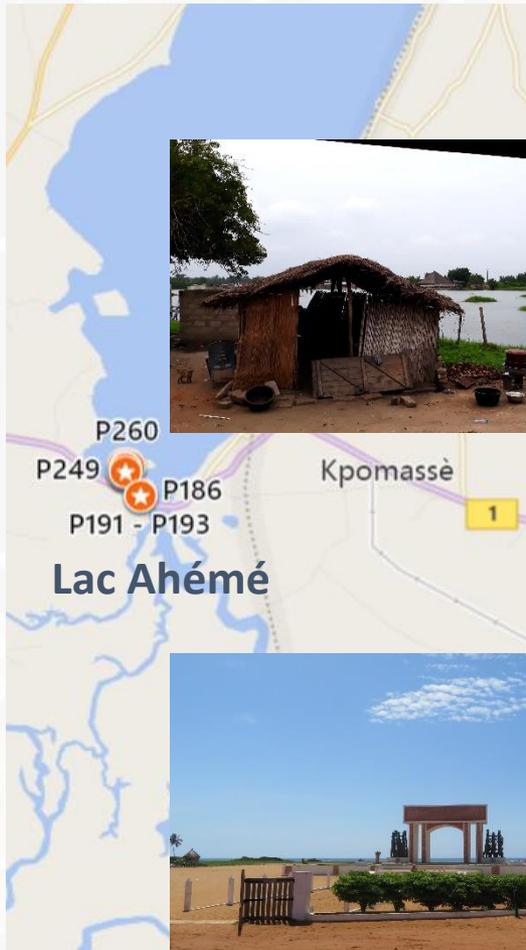
- **Cotonou**

- **Capitale économique** du Bénin
- **Port actif**
- **Climat tropical**, 800-1200mm de pluie par an

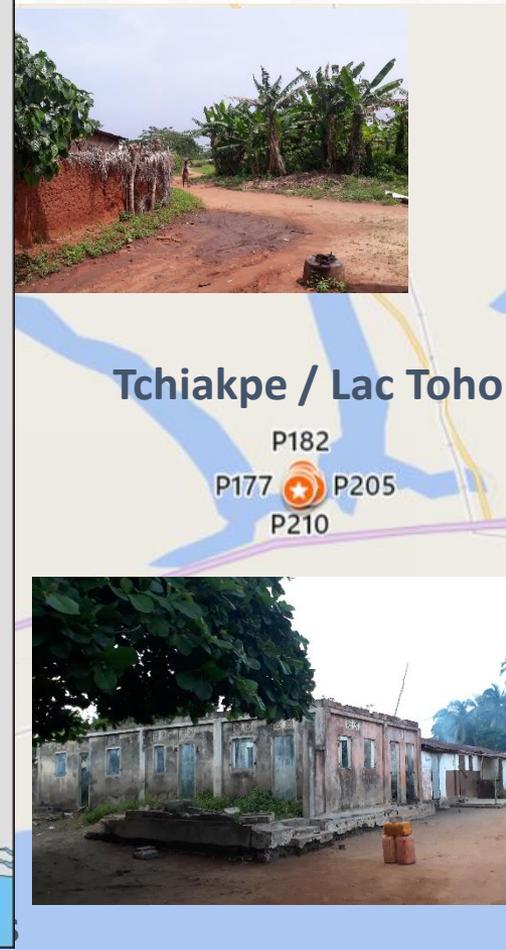
Mission au Bénin / Ouidah

- **Ouidah**

- À 42km de Cotonou
- **Ancien fort portugais**
- Un des principaux centres



d'esclaves

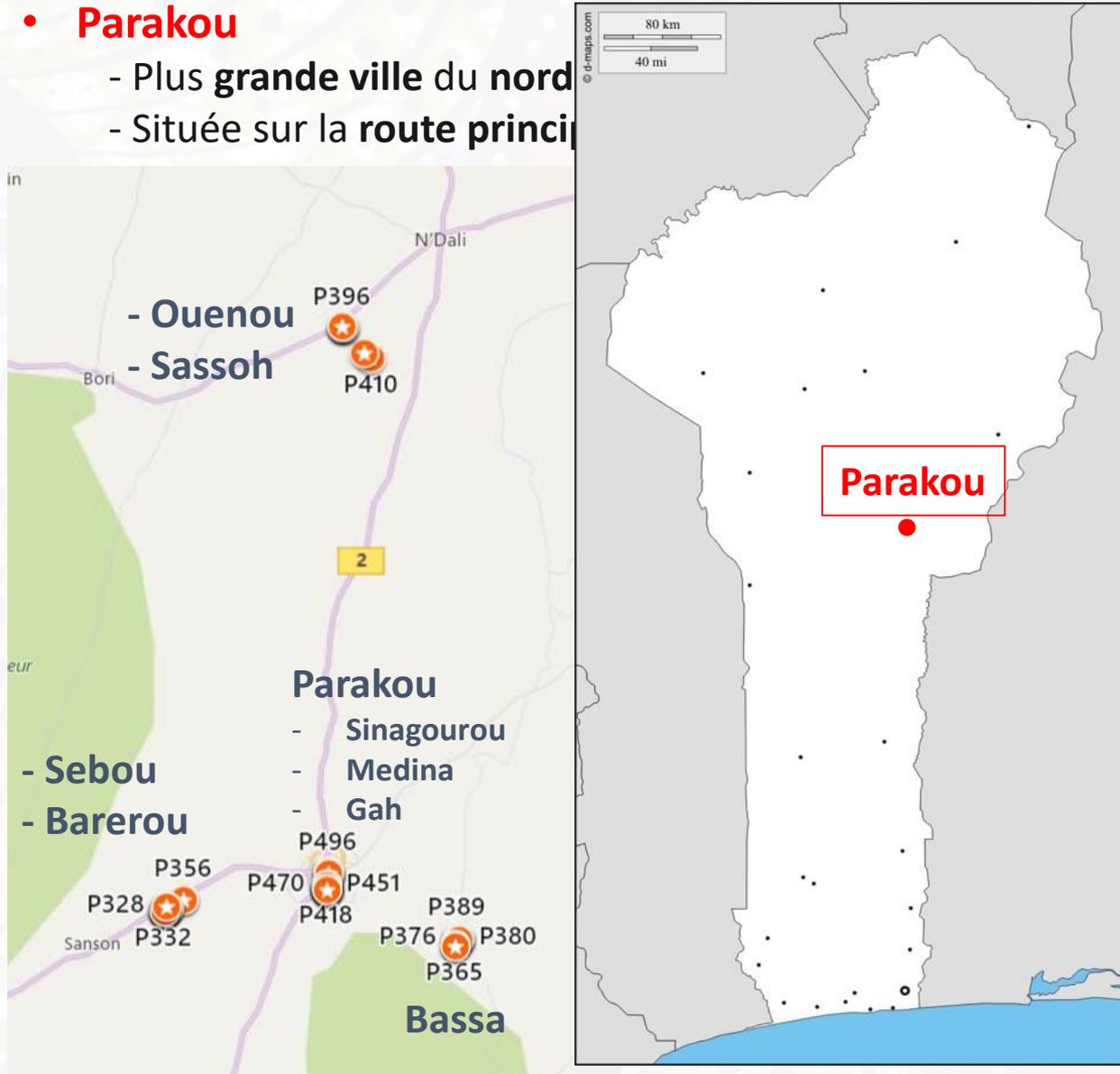


Mission au Bénin / Parakou

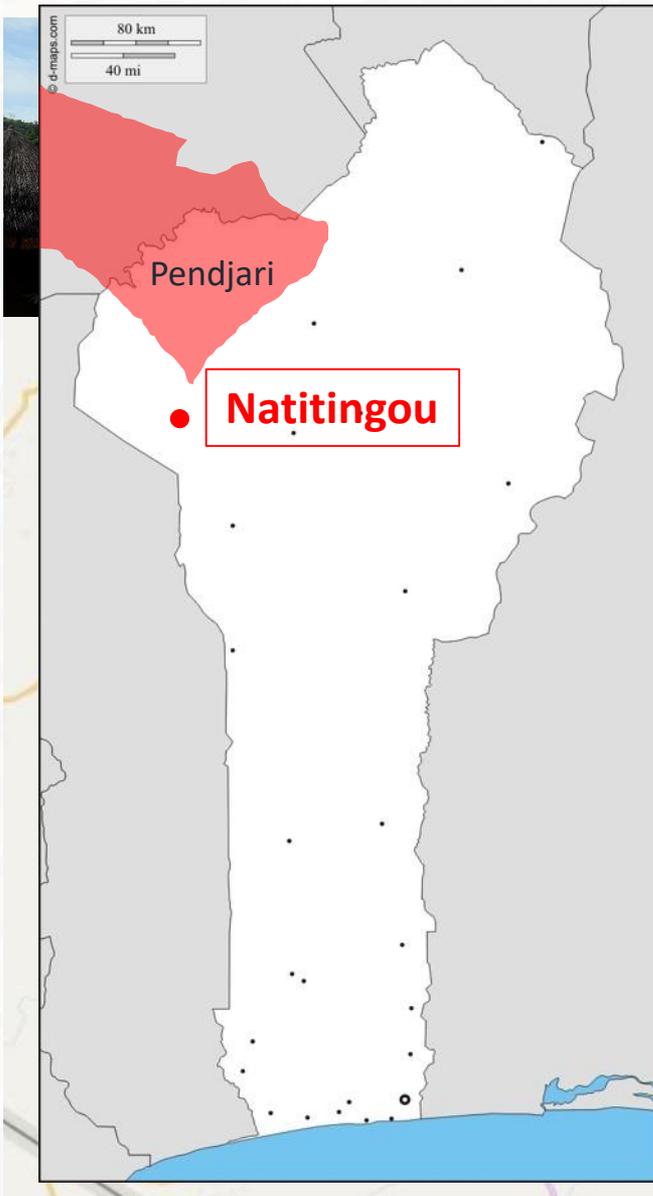
- **Parakou**

- Plus grande ville du nord
- Située sur la route principale

au sud

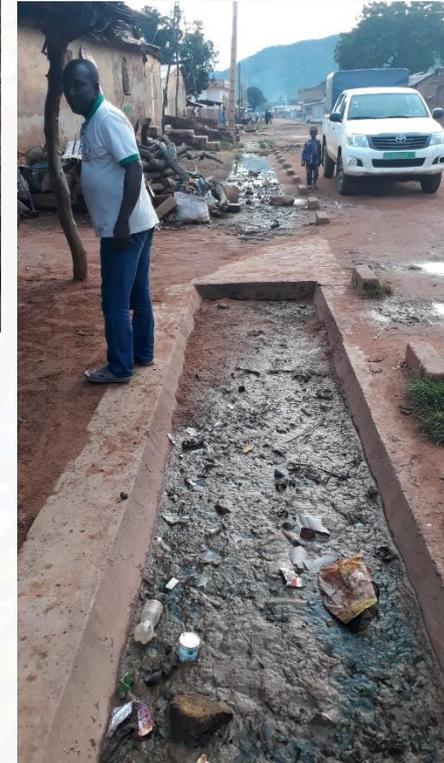


Mission au Bénin / Natitingou



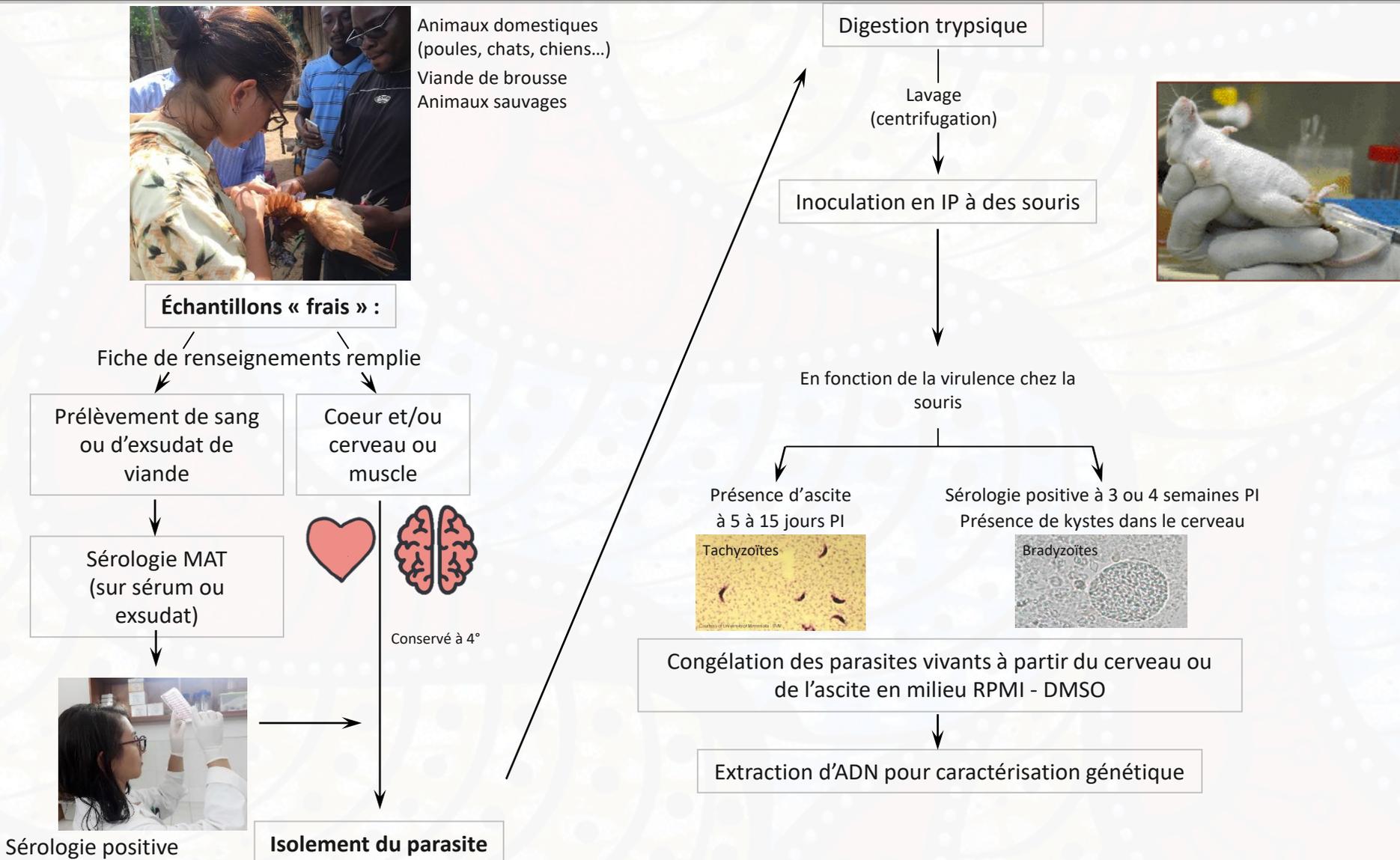
- **Natitingou**

- Située dans une vallée au pied de l'Atacora (641m)
- Climat **soudano-guinéen** (une saison pluvieuse et une saison sèche)
- Entrée du **Parc National de la Pendjari**



Approche méthodologique

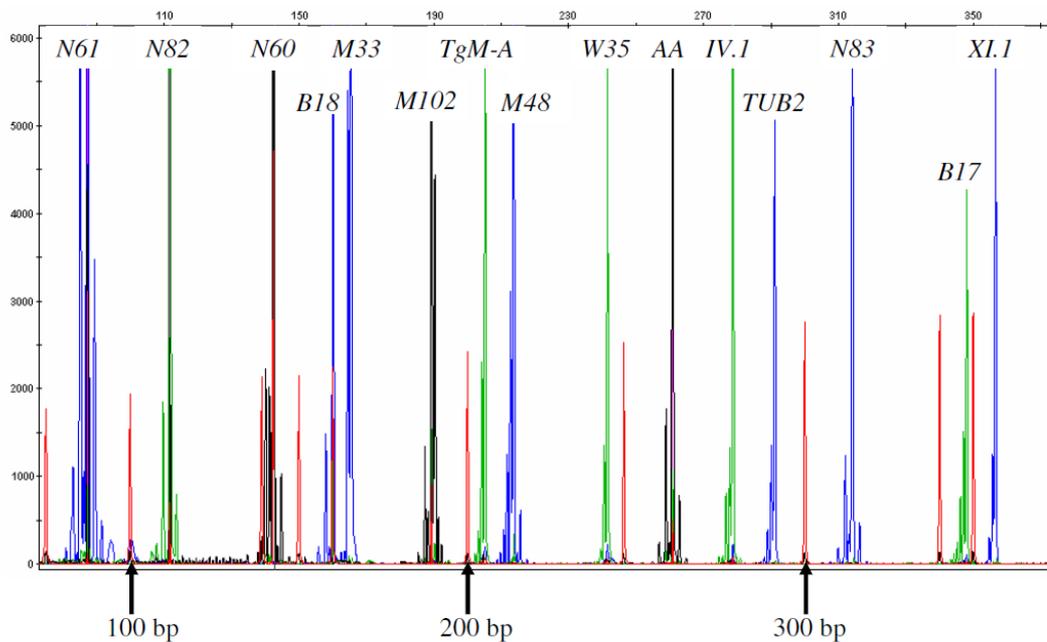
Méthode d'isolement



Approche méthodologique

Caractérisation génétique

- Génotypage à l'aide de **15 marqueurs microsatellites (MS)** situés sur 11 chromosomes →
 - mesure de la diversité à faible échelle de temps
 - minimise les risques d'homoplasie



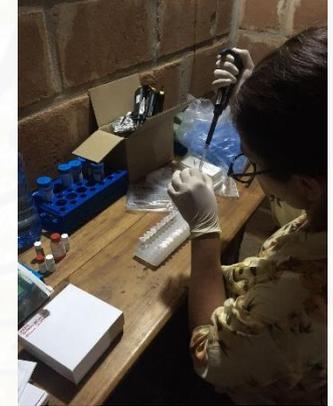
(Ajzenberg et al., 2010)

Électrophorèse du produit d'amplification des 15 MS par PCR multiplex de la souche P89 obtenue sur séquenceur automatique à l'aide du logiciel GeneMapper

Résultats

Echantillonnage

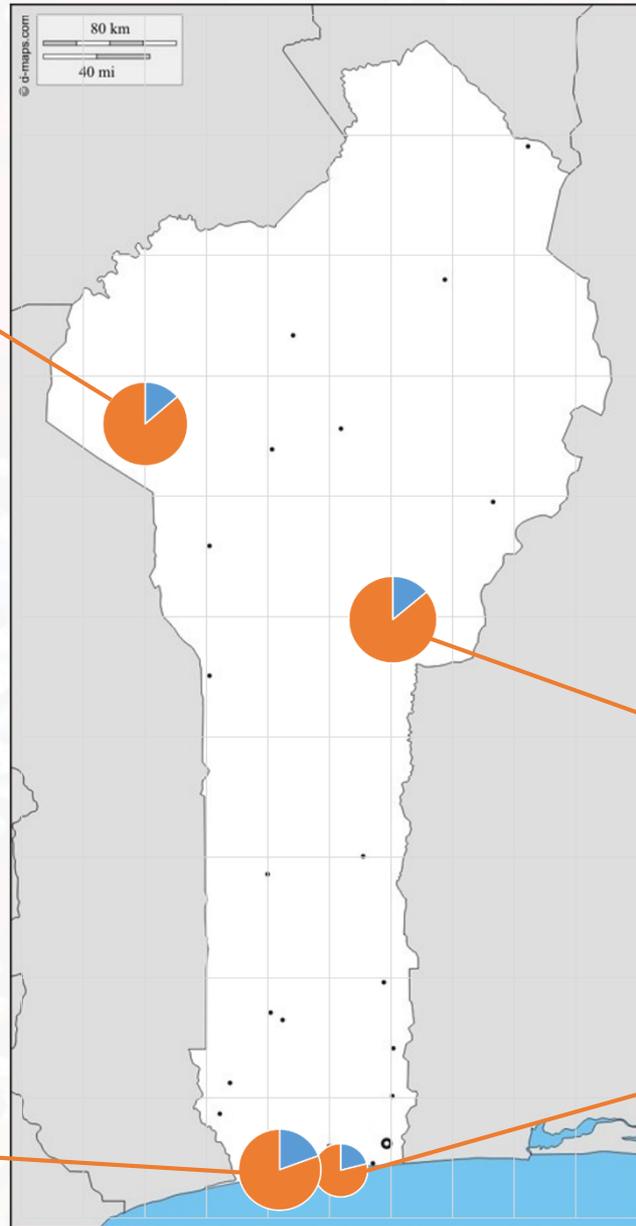
- **759** animaux échantillonnés
 - Poules (n=746)
 - Canards (n=10)
 - Pintades/Dindons (n=2)
 - Epervier (n=1)
- Entre 3 mois et 6 ans
- Femelles = 538
- Mâles = 221



Résultats

Séroprévalence

Natitingou : 12,26%
(95% IC : 7,85-16,68)
(n=212)



Parakou : 13,94%
(95% IC : 9,23-18,65)
(n=208)

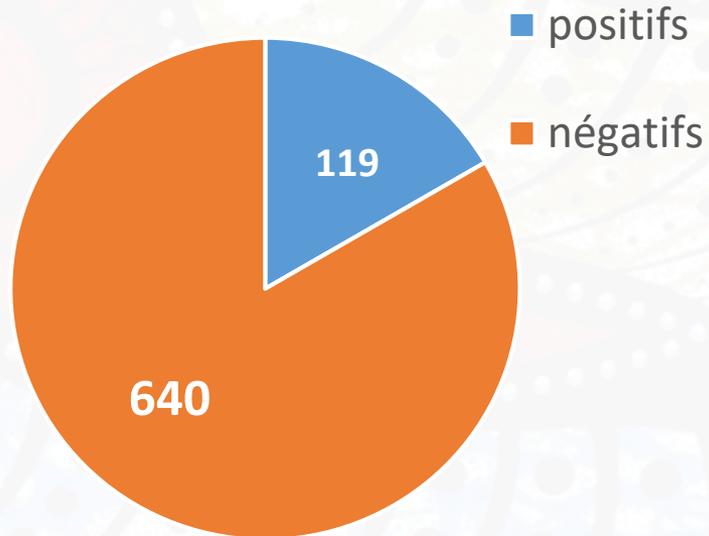
Ouidah : 17,47%
(95% IC : 12,29-22,66)
(n=206)

Cotonou : 21,05%
(95% IC : 14,12-27,98)
(n=133)

Résultats

Séroprévalence globale

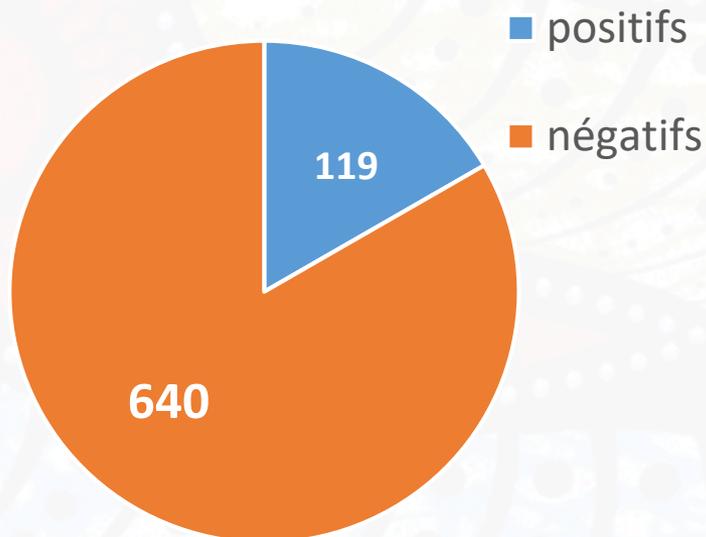
15,68% (95% IC : 13,09-18,27)



Résultats

Séroprévalence globale

15,68% (95% IC : 13,09-18,27)



→ Prévalence faible

Données sur poules :

- Ethiopie : 30,50% (Gebremedhin *et al.*, 2015) et 64% (Tilahun *et al.*, 2013)
- Nigeria : 40,40% (Ayinmode *et al.*, 2014) et 44,80% (IHAT - Aganga and Belino, 1948)
- Ghana : 47% (Dubey *et al.*, 2008)
- Uganda : 50% (Lindstrom *et al.*, 2008)
- RDC, Mali, Burkina-Faso et Kenya : 36,25% (Dubey *et al.*, 2005)
- **Sénégal** : 7,4% (Sarr *et al.*, 2019) et 13,3% (Galal, communication personnelle)
- Gabon : 50,6% (Thèse A. Mercier, 2010)

Résultats

Isolements

45 souches / 69 tentatives

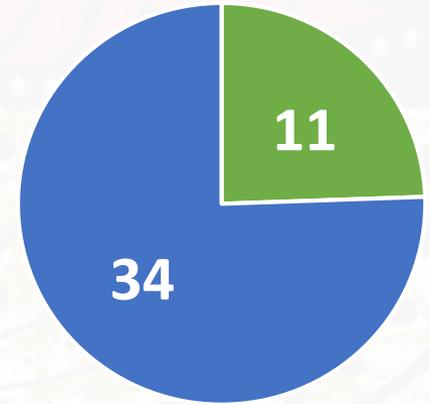
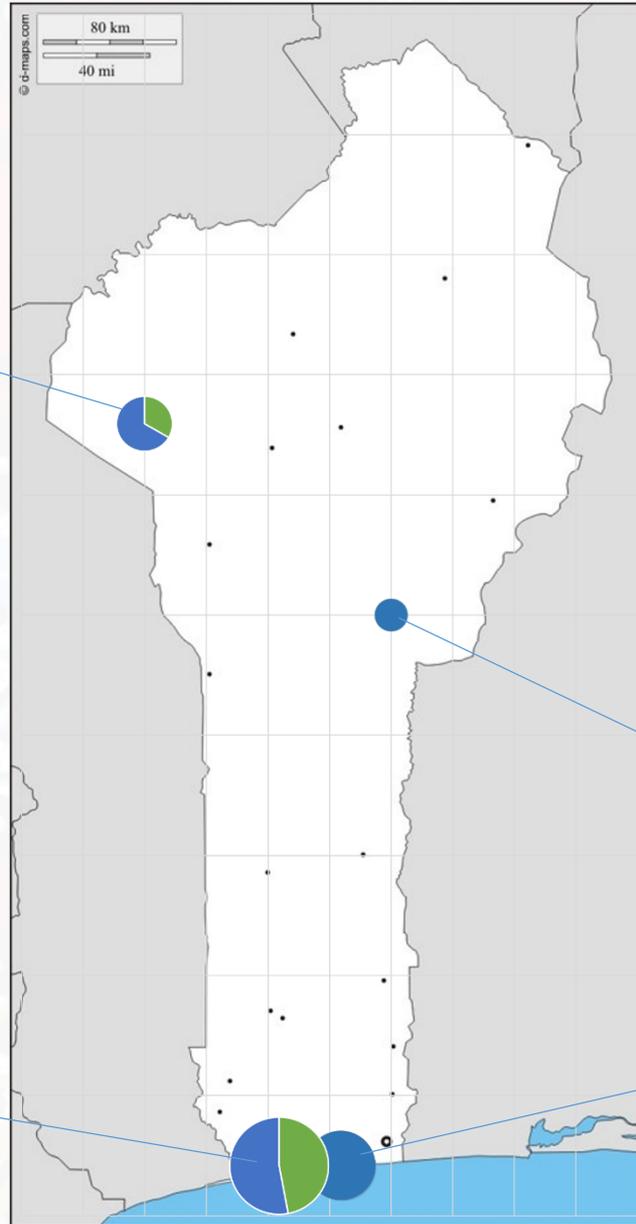
Natitingou : 9/12 souches

- 6 virulentes
- 3 avirulentes



Ouidah : 17/27 souches

- 9 virulentes
- 8 avirulentes



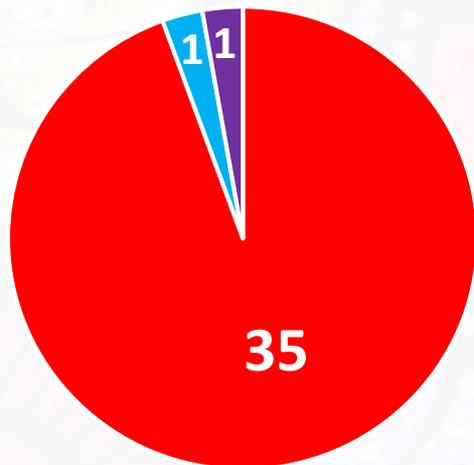
■ Avirulent ■ Virulent

Parakou : 6/17 souches

Cotonou : 13/14 souches

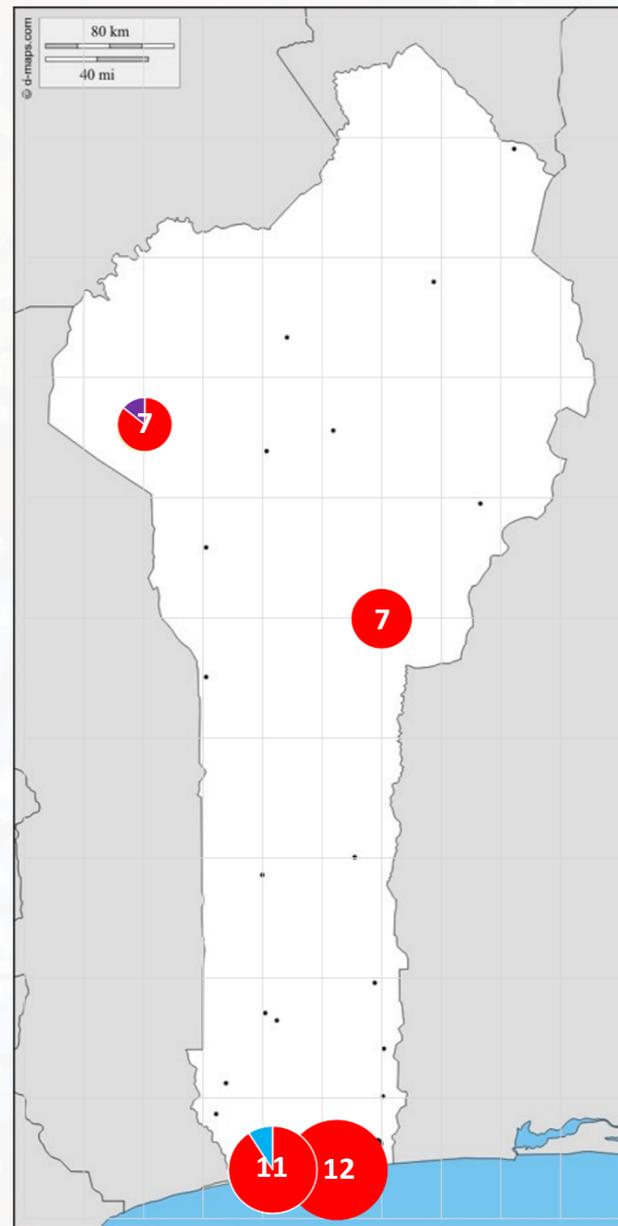
Résultats

Génotypes

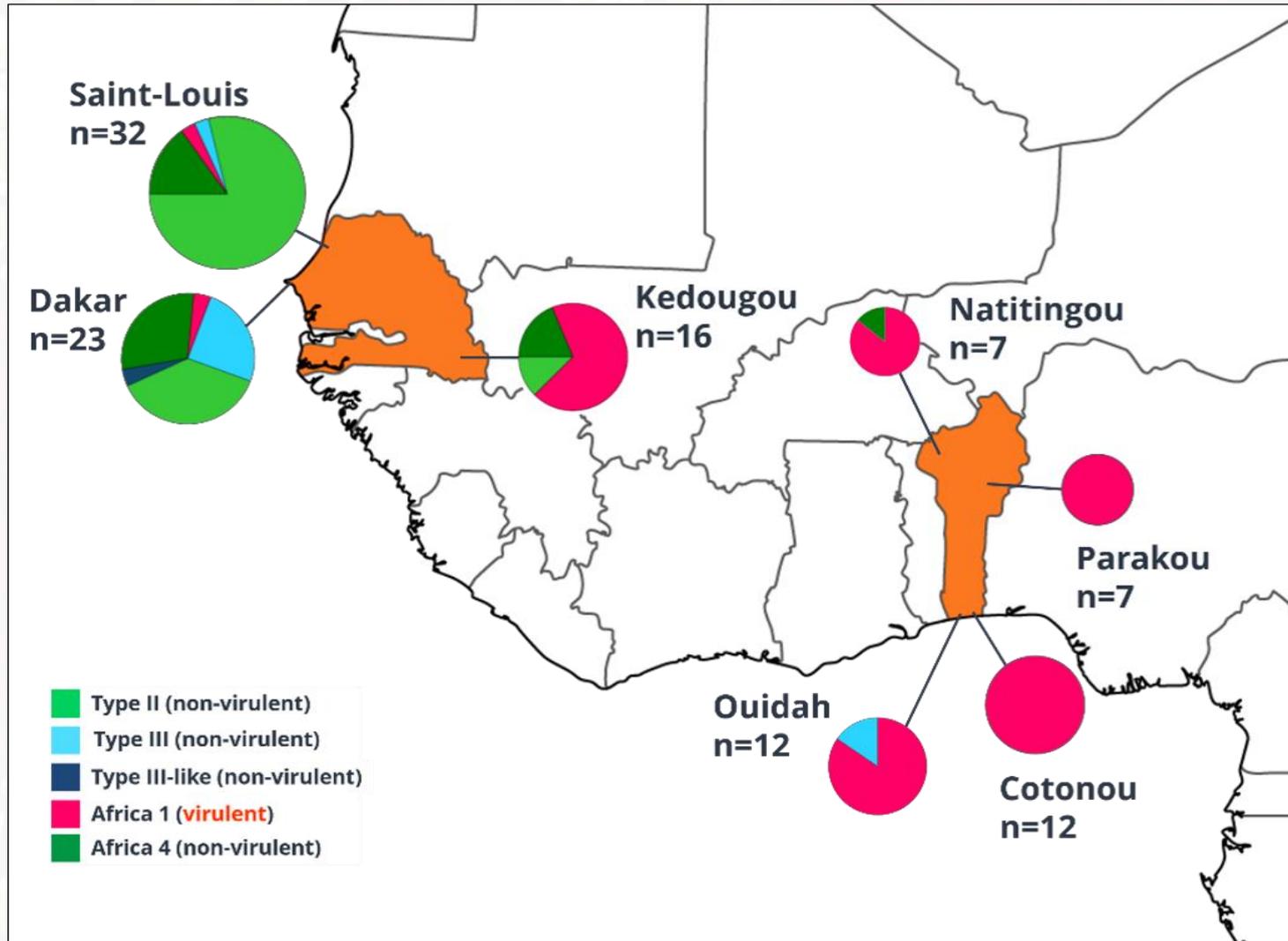


■ Africa 1 ■ Type III ■ Africa 4

- **37 génotypes complets**
- **32 à repasser en simplex (marqueurs manquants)**
 - 9/11 Souches avirulentes + 23 digestats



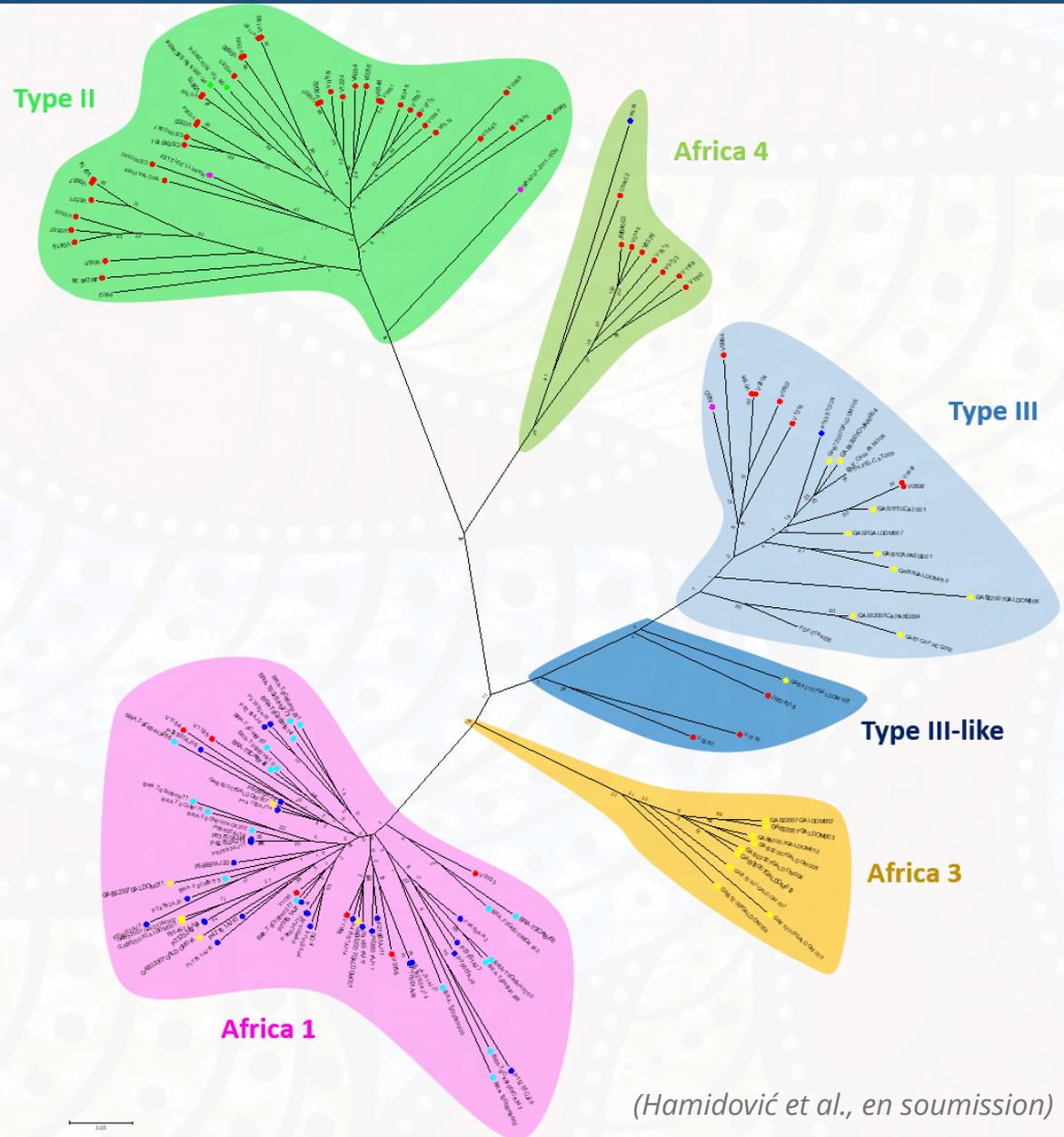
Influence du commerce maritime?



(Hamidović et al., en soumission)

Influence du commerce maritime?

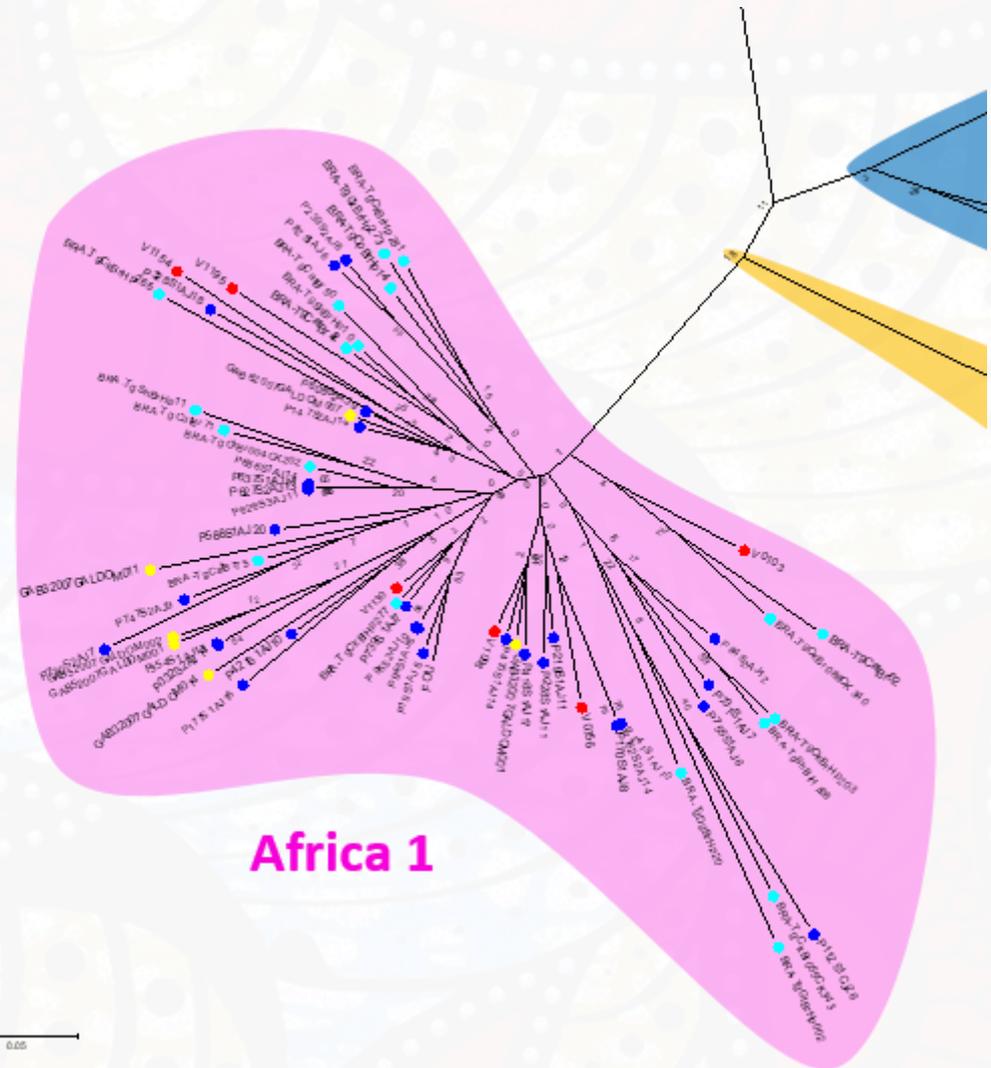
- Benin
 - Senegal
 - Gabon
 - France
 - Portugal
 - South and Central America
- Reference strains : FOU, PRU, NED



(Hamidović et al., en soumission)

Influence du commerce maritime?

- Benin
 - Senegal
 - Gabon
 - France
 - Portugal
 - South and Central America
- Reference strains : FOU, PRU, NED



(Hamidović et al., en soumission)

Hypothèse : introduction de génotypes européens au Bénin

MAIS → Absence totale de type II au Bénin, même sur la côte

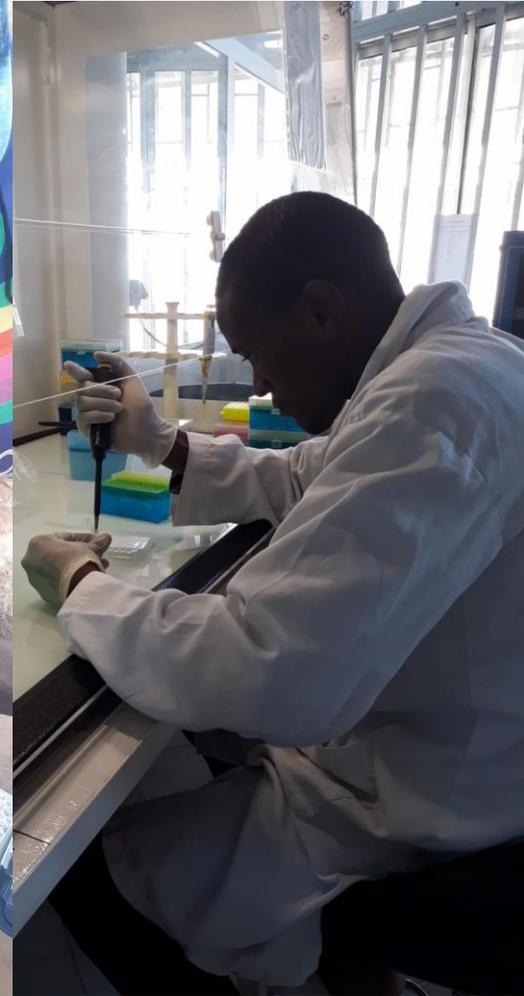
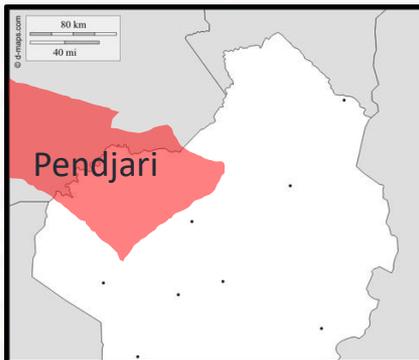
- Limite de l'échantillonnage?
- Difficulté de génotyper les souches avirulentes
- Rongeurs

→ Diversité de l'*Africa 1* (analyses en cours)

- Différences de virulence parmi les *Africa 1* : Souches non virulentes (ou virulentes à +J20 PI) qui font des kystes et pas d'ascite
 - Analyse des gènes de virulence
- Comparaison Intra-Afrique + Amérique du Sud (83 souches du Brésil, Gabon, Sénégal et Bénin + CNR) → *Africa 1* brésilien proche de l'*Africa 1* africain

Suite du projet

- Etudiants formés à l'isolement de souche qui pourront continuer le protocole
 - **Jonas ETOUGBETCHE**
 - **Richard AMAGBEGNON**
 - Aretas TOUNOUHEWA
- Collaboration avec la Pendjari pour échantillons animaux sauvages?
(contact : **Aurlus Ouindeyama**, chargé de suivi Ecologie/Gestion de la faune du parc)



Procédures administratives



REPUBLIQUE DU BENIN
MINISTERE DE L'AGRICULTURE DE L'ELEVAGE ET DE LA PECHE
DIRECTION DE L'ELEVAGE
SERVICE SANTE ANIMALE
CERTIFICAT SANITAIRE POUR ANIMAUX VIVANTS
(HEALTH CERTIFICAT FOR ANIMALS)



Ref. MAEP/DE/ISSA/DSE/CS 010/18

- Nagoya → soumis au point focal depuis le 07 janvier 2019
- Procédures utiles :
 - Importation de souris de laboratoire : Direction de l'élevage (Autorisation d'importation d'animaux de laboratoire)
 - Exportation d'échantillons vers la France : Direction de l'Elevage (Autorisation de collecte et de transport d'échantillons biologiques destinés à la recherche universitaire)
 - Environ 2 semaines pour obtenir les autorisations

Contacts à la DE :

- Mme Gao (secrétaire) : 97 42 42 40
- M. Oke (intérimaire) : 97 87 89 72
- Dr. Tchouchou (chef de service « Contrôle ») : 95 71 70 94
- Dr. Gnanvi (chef de service « Santé animale ») : 97 22 22 48

Perspectives

Dans l'immédiat :

- Analyse d'échantillons de rongeurs de Cotonou (environ 1000, cœurs + cerveaux)
- Préparation d'échantillons pour des analyses génomiques
- Formation en bioinformatique (Roscoff)

Ecriture :

- Début de rédaction de la thèse
- Article technique : Comparaison qPCR cœur VS cerveaux de rongeurs
- Article génotypes au Bénin : pourrait contredire le projet ANR
- Autre article potentiel sur des analyses génomiques (cf Post-doc de Lokman Galal)

- Thèse Jonas ETOUGBETCHE

Remerciements



Aurélien MERCIER
Marie-Laure DARDÉ
Lokman GALAL
Nicolas PLAULT
Océane MAUGRION
Elodie BARBOSSA
Pacôme SIENTZOFF
Salmane AMIDOU
Ines YORO
Pierre-Marie PREUX



Florent ENGELMANN
Bellinda HOUNMASSE
Gérard KPOHOENON
Japhete, Fréjus et Mohamed



Gauthier DOBIGNY
Carine BROUAT
Laurent GRANJON



Nadine FIEVET
André GARCIA
Firmine VIWAMI
Pépin KOUNOU
Laurine MAURICE
Magalie DAMBRUN
Florence MIGOT-NABIAS



Gualbert HOUEMENOU
Jonas ETOUGBETCHE
Aretas TOUNOUHEWA
Sylvestre BADOU



Anatole LALEYE
Marius ADJAGBA
Honoré DA ZOCLANCLOUNON
Constant DJOKPE
Dorothee KINDE-GAZARD
Richard AMAGBEGNON

Bloqués!



3h après... enfin libres!

Merci pour votre attention

