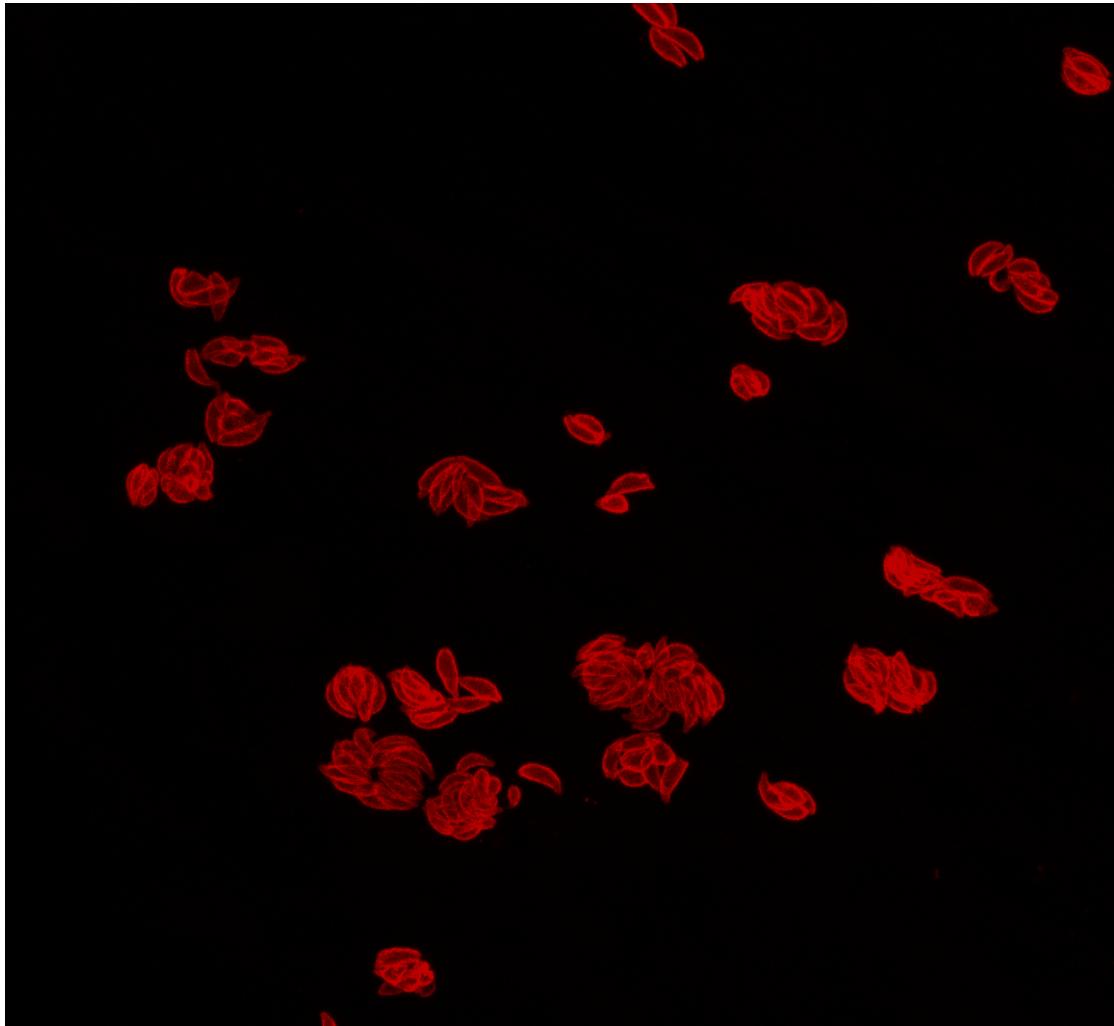


**Rôle de la protrusion du conoïde dans l'invasion des cellules**

**hôtes par le parasite intracellulaire obligatoire**

*Toxoplasma gondii*



Travail de maturité réalisé par  
Ana Bolivar

Maîtresse accompagnante : Mme Tania Buhler Garrido

COLLEGE VOLTAIRE  
GENEVE

2020-2021

## Table des matières

Introduction .....	3
Chapitre 1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	5
1.1. Cycle de vie .....	5
1.2. Morphologie .....	7
1.3. Protéines étudiées .....	9
Chapitre 2. Mobilité et mécanismes d'invasion et de sortie de la cellule hôte ....	11
2.1. L'attachement .....	12
2.2. L'invasion .....	13
2.3. La multiplication intracellulaire et la sortie .....	14
Chapitre 3. Partie expérimentale .....	14
3.1. « Mise en culture » .....	16
3.2. « Western Blot » .....	17
3.3. « Egress Assay » .....	19
3.4. « Ultrastructure expansion microscopy » .....	23
3.5. Synthèse des résultats .....	24
3.6. Interprétation des résultats .....	26
Conclusion .....	28
Bilan personnel .....	29
Remerciements .....	30
Notes de bas de page du glossaire .....	31
Bibliographie .....	32

## Introduction

Les maladies infectieuses sont responsables de 17 millions de décès par an dans le monde. Elles sont causées par différents agents infectieux<sup>1</sup>.

Les bactéries sont des organismes vivants procaryotiques (cellules sans noyau) unicellulaire. Présentes dans tous les milieux, y compris dans le corps humain, elles sont, pour la plupart, bénéfiques ou sans danger pour les organismes qu'elles colonisent. Néanmoins, certaines d'entre elles peuvent causer de graves infections, comme la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) responsable de la mort de deux millions de personnes par an<sup>2</sup>.

Les champignons sont des organismes vivants eucaryotiques (cellules avec noyau) uni ou pluricellulaires. Chez l'homme, l'infection se produit souvent par le biais de spores dans l'air ou le sol qui envahissent les poumons ou se déposent sur la peau (mycoses)<sup>3</sup>.

Les virus sont des particules infectieuses. Leur statut d'organisme vivant est controversé. Ils vivent aux dépens d'un autre organisme que l'on désigne « l'hôte ». Les virus n'ont pas d'organites, ce qui les rend totalement dépendants de leurs hôtes. Il existe à ce jour cent-vingt-neuf espèces de virus pathogènes connues, dont la grippe, l'Ébola et le SIDA<sup>4</sup>.

Les parasites sont des organismes vivants eucaryotiques uni ou pluricellulaires. A l'instar des virus, ils nécessitent un hôte pour s'abriter, se nourrir et se reproduire<sup>5</sup>. Il en existe trois types : les ectoparasites (multicellulaires externes) (poux ; tiques ; etc), les helminthes (multicellulaires internes) (vers) et les parasites protistes (unicellulaires) (*Toxoplasma gondii* ; *Plasmodium falciparum* [paludisme])<sup>6</sup>.

Les parasites protistes comprennent plusieurs branches dont fait partie celle des sporozoaires, aussi désignés les Apicomplexes. Ceux-ci sont tous des parasites intracellulaires obligatoires d'animaux (dont les hommes) qui font fréquemment intervenir plusieurs hôtes durant leur vie (cf. infra, Chapitre 1.1)<sup>7</sup>. Ils possèdent une organelle particulière localisée à leur pointe et désignée conoïde, auquel sont liées différentes protéines. Ils contiennent également des organelles, localisées à leur

### GLOSSAIRE

(sources du glossaire: cf. infra, notes de bas de page en p. 31)

Organite (ou organelle) :

Structure spécialisée, délimitée par une membrane se trouvant à l'intérieur d'une cellule<sup>1bis</sup>

<sup>1</sup> **Maladie infectieuse** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Maladie\\_infectieuse](https://fr.wikipedia.org/wiki/Maladie_infectieuse), (site consulté le 03.07.2021)

<sup>2</sup> **Bactérie** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Bactérie> (site consulté le 03.07.2021)

<sup>3</sup> **Présentation des infections mycosiques** [en ligne], <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-mycosiques/présentation-des-infections-mycosiques>, (site consulté le 03.07.2021)

<sup>4</sup> **Virus** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Virus> (site consulté le 03.07.2021)

<sup>5</sup> **Parasite, champignon, bactérie et virus : quelles différences ?** [en ligne], <https://www.media-chimie.org/actualite/parasite-champignon-bactérie-et-virus-quelles-différences>, (site consulté le 03.07.2021)

<sup>6</sup> **Prise en charge des infections parasitaires** [en ligne], <https://www.msmanuals.com/fr/professionnal/maladies-infectieuses/prise-en-charge-des-infections-parasitaires/prise-en-charge-des-infections-parasitaires>, (site consulté le 03.07.2021)

<sup>7</sup> **Apicomplexa** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Apicomplexa>, (site consulté le 13.04.2021)

pôle apical, désignées micronèmes et rhoptries, qui sécrètent d'autres protéines (cf. infra, Chapitres 1.2 et 1.3)<sup>8</sup>.

*T. gondii* est un Apicomplexe, responsable de la toxoplasmose, maladie qui touche près d'un quart de la population mondiale. Cette infection est la plupart du temps bénigne et asymptomatique. Elle peut cependant se révéler dangereuse, voire mortelle chez les personnes souffrant d'une **immunosuppression** (infection virale, traitement de cancer ou transplantation d'organe). Elle provoque chez celles-ci des inflammations graves (encéphalites, pneumonies, myocardites ou hépatites). La toxoplasmose congénitale est une infection sérieuse qui peut avoir des conséquences importantes sur la santé ou la survie du fœtus (atteintes cérébrales et oculaires)<sup>9</sup>.

Du fait de son accessibilité génétique et expérimentale, *T. gondii* sert de modèle pour les Apicomplexes et fait l'objet de nombreuses études sur ses mécanismes de mobilité et d'invasion, ainsi que de sortie de son hôte (cf. infra, Chapitre 2)<sup>10</sup>.

Des protéines déterminantes ont été localisées de manière précise au conoïde grâce à de nouvelles méthodes d'observation<sup>11</sup>.

Il sera examiné si et comment la déstabilisation de ces protéines a une incidence sur les mécanismes précités et sur la sécrétion de protéines par les micronèmes, qui précèdent celles sécrétées par les rhoptries (cf. infra, Chapitres 3.3 et 3.4)<sup>12</sup>.

Par ailleurs, il a été constaté que le conoïde « **protrude** » (adopte une position de protrusion) lorsque le parasite se meut, envahit et sort de sa cellule hôte. Cette organelle et sa protrusion suscitent de nombreuses questions quant à leurs rôles et fonctionnements, lesquels restent à ce jour non expliqués<sup>13</sup>.

La protrusion du conoïde, en particulier en quoi elle serait impactée par la déstabilisation des protéines citées plus tôt, est au centre de ce travail (cf. infra, Chapitre 3.4)<sup>14</sup>.

**Immunosuppression** : Réduction ou suppression de l'activation du système immunitaire<sup>2bis</sup>

**Protrusion** : Mécanisme qui pousse un organe vers l'avant<sup>3bis</sup>

<sup>8</sup> **Apicomplexé** [en ligne], <https://www.aquaportail.com/definition-14015-apicomplexe.html>, (site consulté le 27.07.2021)

<sup>9</sup> **FRENAL Karine et SOLDATI-FAVRE Dominique**, « Un complexe moléculaire unique à l'origine de la mobilité et de l'invasion des Apicomplexes », in *Médecine/Sciences*, vol. 29, 2013, n. 5, p. 515-22

<sup>10</sup> *ibid.*

<sup>11</sup> **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, « Evolution, Composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa », in *Cell Press reviews*, 2003

<sup>12</sup> **SOLDATI-FAVRE Dominique**, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 19.10.2020

<sup>13</sup> **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, *op. cit.*, n. 4

<sup>14</sup> **SOLDATI-FAVRE Dominique**, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 19.10.2020



# Chapitre 1. *Toxoplasma gondii*

## 1.1 Cycle de vie

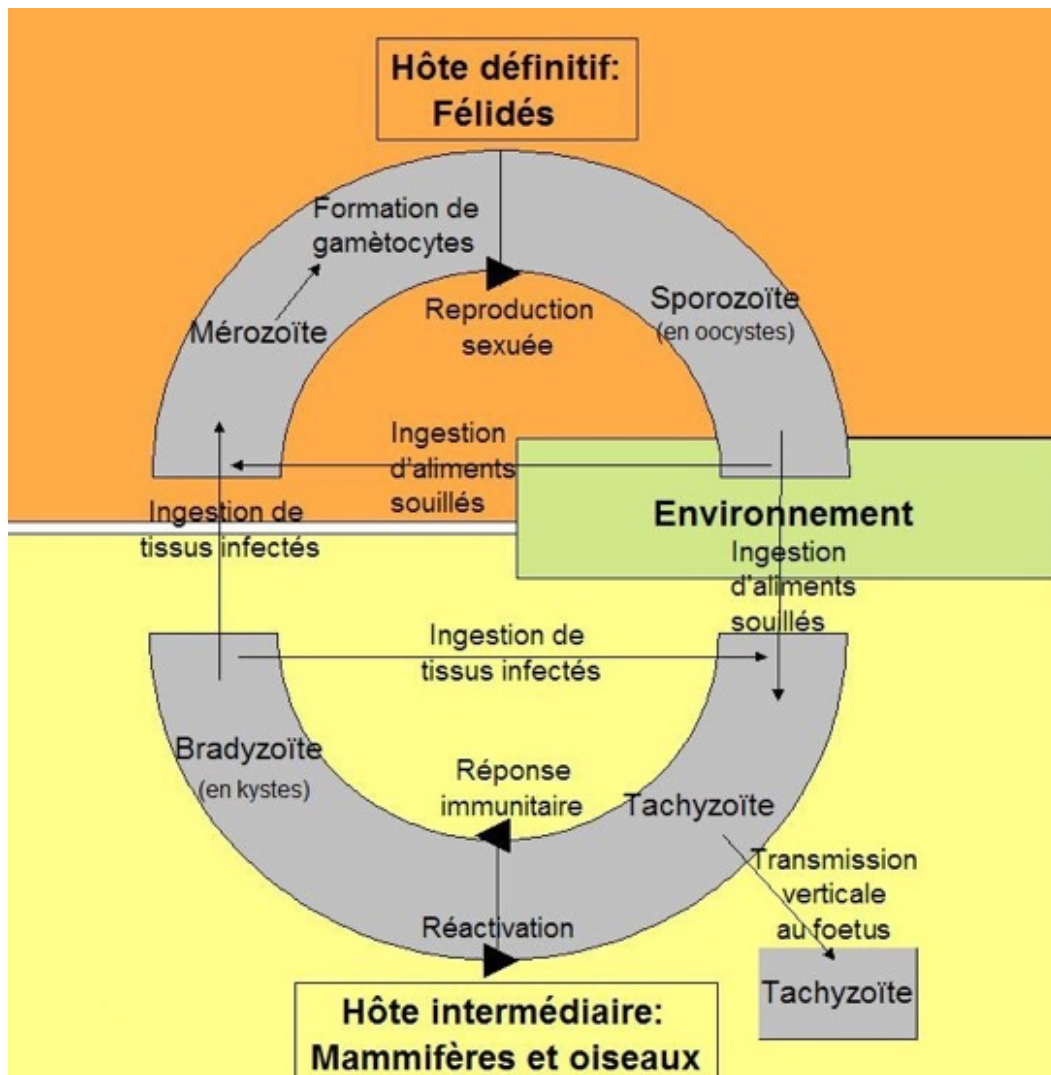


Figure 1<sup>15</sup>

*T. gondii* est relativement autonome. Grâce à ses organites, ce parasite synthétise et transporte une partie des protéines, lipides et énergie dont il a besoin. Néanmoins, il a besoin de la cellule-hôte pour se procurer le reste des nutriments nécessaires à sa survie (parasite intracellulaire obligatoire)<sup>16</sup>.

Les hôtes de *T. gondii* sont les mammifères et les oiseaux (hôtes intermédiaires) ainsi que les félinidés (hôtes définitifs). Ces derniers sont désignés définitifs, car il s'agit des seuls hôtes dans lesquels le parasite peut se multiplier de manière sexuée. Indépendamment de son hôte, le parasite se transforme en fonction de son milieu (selles, sang, tissus, etc.), lequel dépend des différents stades de la contamination<sup>17</sup>.

**Reproduction sexuée :** Reproduction entre deux organismes de sexes différents (intervention d'une gamète mâle et femelle)<sup>4bis</sup>

<sup>15</sup> *Toxoplasma gondii* [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii), (site consulté le 22.07.2021)

<sup>16</sup> *ibid.*, (site consulté le 22.07.2021)

<sup>17</sup> *ibid.*, (site consulté le 06.04.2021)

Les hôtes intermédiaires sont infectés par différents biais :

- A. Ingestion de selles déposées sur les mains ou d'aliments contaminés par les selles (le parasite se trouve sous forme **sporozoïte**, *ie* à l'intérieur d'un oocyste)
- B. Transmission de la mère au fœtus ou transfusion de sang contaminé (le parasite se trouve sous forme **tachyzoïte**)
- C. Ingestion de viandes crues contaminées ou transplantation d'organe (le parasite se trouve sous forme **bradyzoïte**, *ie* à l'intérieur d'un kyste)<sup>18</sup>

Les étapes de la contamination des hôtes intermédiaires sont les suivantes :

Dans l'intestin de son hôte, le parasite passe de sa forme sporozoïte à sa forme tachyzoïte, franchit l'intestin, se reproduit de **manière asexuée** dans les cellules de l'hôte et se dissémine par la voie du sang<sup>19</sup>.

Lors de la réaction immunitaire de l'hôte qui s'ensuit, le parasite passe de sa forme tachyzoïte à sa forme bradyzoïte (forme dite enkystée) dans différents organes où l'immunité est moins forte, comme les muscles, le cœur ou le cerveau. Il s'agit de sa forme dormante qui lui permet d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte<sup>20</sup>.

Cette forme est réversible : le parasite peut reprendre sa forme précédente (tachyzoïte) lorsqu'il change d'hôte à l'occasion d'une nouvelle contamination décrite ci-dessus sous let. C. Le parasite peut également se réactiver chez le même hôte lors d'une immunosuppression<sup>21</sup>.

Quant aux hôtes définitifs, ils sont infectés par l'ingestion d'aliments contaminés par des selles (cf. ci-dessus, let. A) ou de viandes crues contaminées (cf. ci-dessus, let. C)<sup>22</sup>.

Les étapes de la contamination des hôtes définitifs sont les suivantes :

Dans l'intestin de son hôte, le parasite passe de sa forme sporozoïte ou bradyzoïte à sa forme **mérozoïte** et se multiplie de manière sexuée. Les parasites produits (sous forme sporozoïte) sont éliminés dans les selles sous forme d'oocystes, ce qui permet la contamination d'un nouvel hôte (cf. ci-dessus, let. A)<sup>23</sup>.

**Sporozoïte** : Forme de dissémination produite par une reproduction sexuée chez l'hôte définitif se trouvant dans des oocystes (10 à 15 µm) contenant jusqu'à 8 parasites<sup>5bis</sup>

**Tachyzoïte** : Forme proliférative chez l'hôte intermédiaire qui se développe dans des vacuoles contenant jusqu'à 128 parasites<sup>6bis</sup>

**Bradyzoïte** : Forme de résistance chez l'hôte intermédiaire se trouvant dans des kystes (100 µm de diamètre contenant des milliers de parasites)<sup>7bis</sup>

**Reproduction asexuée** : Reproduction d'un organisme seul, sans partenaire (pas d'intervention de gamètes)<sup>8bis</sup>

**Mérozoïte** : Forme capable de se multiplier de manière sexuée chez l'hôte intermédiaire<sup>9bis</sup>

<sup>18</sup> **Toxoplasmose** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasmose>, (site consulté le 06.07.2021)

<sup>19</sup> **Toxoplasma Gondii** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii), (site consulté le 13.04.2021)

<sup>20</sup> **Toxoplasmose** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasmose>, (site consulté le 06.07.2021)

<sup>21</sup> *ibid.*, (site consulté le 06.07.2021)

<sup>22</sup> *ibid.*, (site consulté le 06.07.2021)

<sup>23</sup> *ibid.*, (site consulté le 06.07.2021)

## 1.2 Morphologie

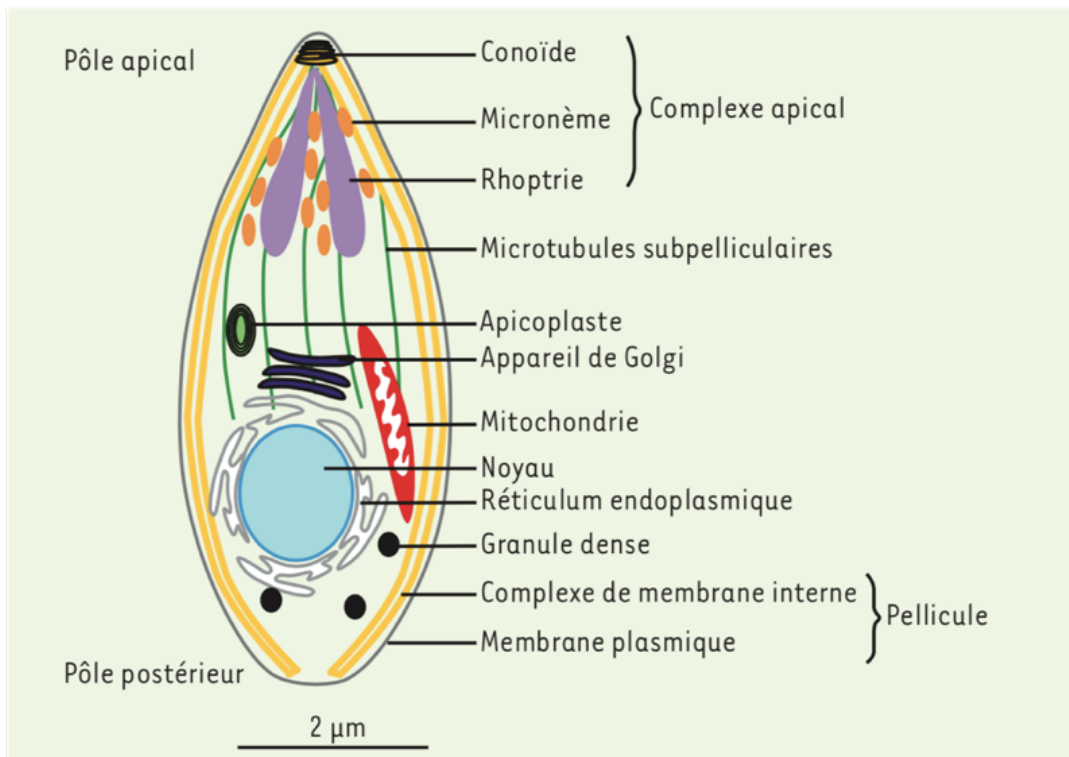


Figure 2<sup>24</sup>

Chez les Apicomplexes, les systèmes de mobilité et d'invasion sont caractérisés par la présence de deux structures spécifiques<sup>25</sup>.

La première particularité morphologique des Apicomplexes réside dans la pellicule délimitant le parasite (Figure 2). Outre la **membrane plasmique**, présente chez de nombreux organismes, elle contient un complexe membranaire interne (formé de deux membranes que l'on désigne l'une « d'interne » et l'autre « d'externe ») (CMI). Cette particularité joue un rôle important dans la mesure où entre la membrane plasmique et la membrane externe du CMI réside le « glidéosome », soit un complexe moléculaire permettant à *T. gondii* de se mouvoir<sup>26</sup>.

La seconde particularité est le complexe apical. Celui-ci est impliqué dans les mécanismes de sortie et d'entrée du parasite dans la cellule hôte. Ce complexe est composé d'un capuchon apical (Figure 3), d'un complexe conoïdien (Figure 4) et d'organites sécrétoires (Figure 5)<sup>27</sup>.

**Membrane plasmique** : Membrane délimitant l'intérieur de la cellule et son environnement<sup>10bis</sup>

<sup>24</sup> FRENAL Karine et SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 4

<sup>25</sup> DOS SANTOS PACHECO Nicolas, op. cit., n. 4

<sup>26</sup> ibid.

<sup>27</sup> ibid.

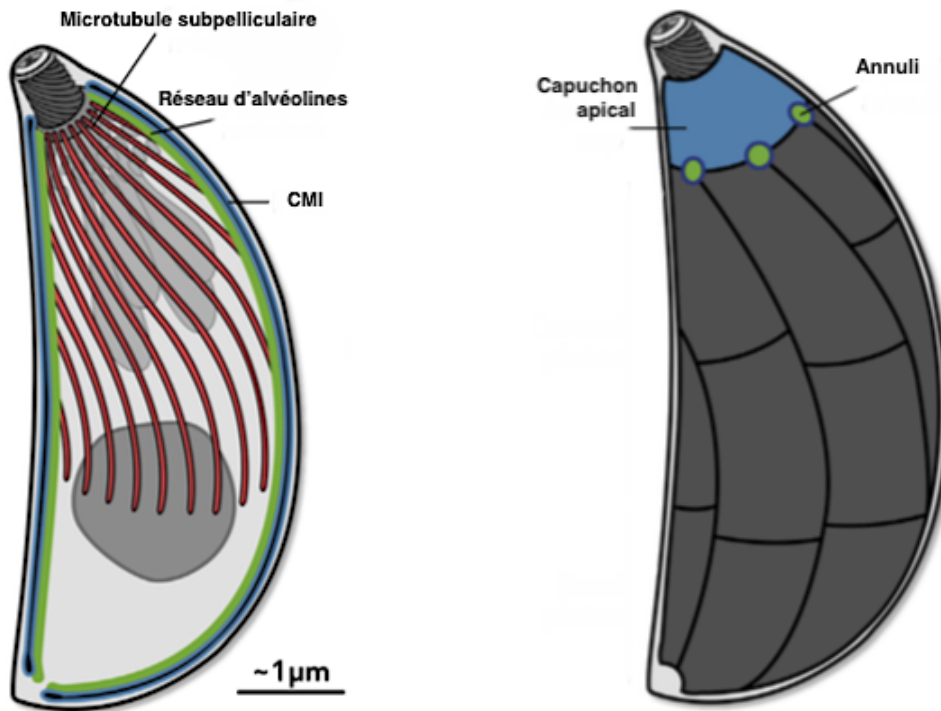


Figure 3<sup>28</sup>

Le capuchon apical comprend la partie supérieure du complexe de la membrane interne (CMI) qui enveloppe le conoïde et les organites sécrétoires. Le CMI est renforcé par un réseau d'alvéolines et des microtubules subpelliculaires qui facilitent l'invasion, en augmentant la rigidité de la structure du parasite<sup>29</sup>. Le capuchon apical comprend plusieurs protéines associées à des structures, appelées « annuli », dont la fonction reste mystérieuse à ce jour<sup>30</sup>.

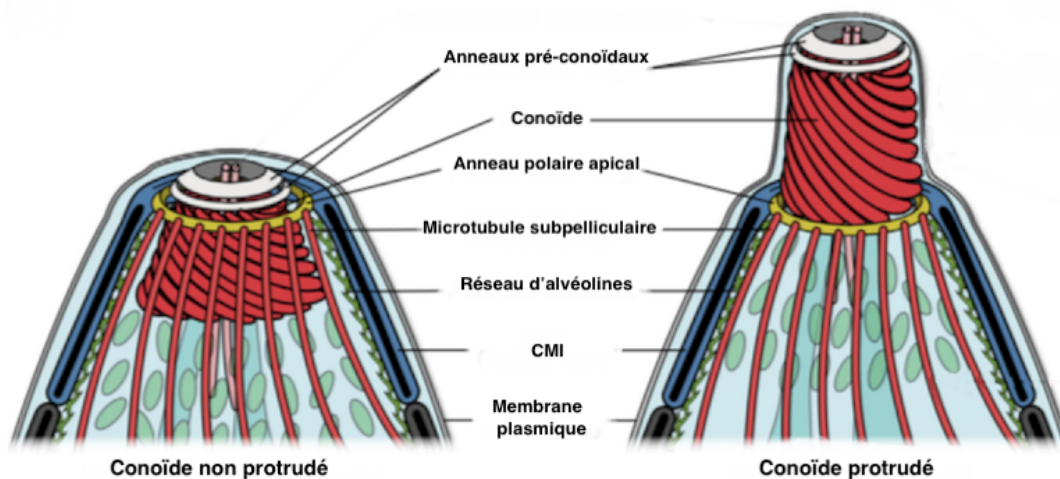


Figure 4<sup>31</sup>

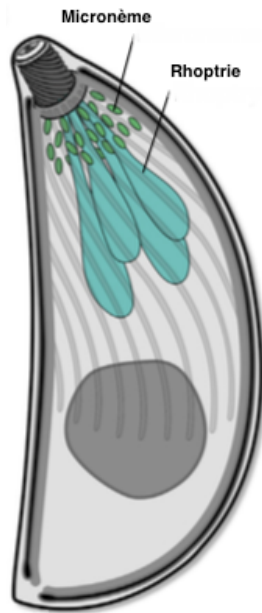
<sup>28</sup> Adapté de **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, op. cit., n. 4

<sup>29</sup> **FRENAL Karine**, « Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa », in *Nature reviews*, vol. 15, 2017

<sup>30</sup> **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, op. cit., n. 4

<sup>31</sup> Adapté de **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, op. cit., n. 4

Le complexe du conoïde est composé du conoïde, de deux anneaux pré-conoïdaux (PCR) et de l'anneau polaire apical (APR) où sont attachés les microtubules subpelliculaires. Le conoïde est un organite composé de fibres de tubuline qui se situe à l'intérieur de l'APR et est surmonté par les deux PCR. Cet organite dont la protrusion intervient lors de l'invasion et de la sortie de la cellule hôte par le parasite suscite de nombreuses interrogations<sup>32</sup>.



Les organites sécrétoires (micronèmes et rhoptries) déchargent les protéines impliquées dans les mécanismes d'entrée et de sortie du parasite<sup>33</sup>.

Les micronèmes libèrent les protéines MIC et AM1 (**adhésines**). Les rhoptries libèrent les protéines RON et ROP (protéines du col et du bulbe). Celles-ci s'assemblent et induisent la formation d'une jonction mobile entre la membrane plasmique de l'hôte et les adhésines. Le parasite pénètre dans la cellule de l'hôte par cette jonction<sup>34</sup>.

Figure 5<sup>35</sup>

### 1.3 Protéines étudiées

Grâce à une nouvelle méthode appelée « **l'ultrastructure expansion microscopy** » (U-ExM) (cf. infra, Chapitre 3.4), de nombreuses protéines du parasite ont été localisées précisément et identifiées.

Six d'entre elles sont apparues complémentaires et indispensables dans l'invasion de l'hôte :

1) et 2) Les protéines apicales du capuchon : Apical Cap 9 et 10 (AC9 et AC10) sont intercalées entre les microtubules subpelliculaires à l'intérieur du réseau alvéolaire (cf. supra, Chapitre 1.2, Figure 4). Leur rôle est structurel<sup>36</sup>.

**Adhésine** : Protéine de liaison qui sert d'adhérence<sup>11bis</sup>

**Ultrastructure expansion microscopy** : Méthode d'agrandissement qui permet d'observer des structures microscopiques<sup>12bis</sup>

<sup>32</sup> DOS SANTOS PACHECO Nicolas, op. cit., n. 4  
<sup>33</sup> ibid.  
<sup>34</sup> FRENAL Karine et SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 4  
<sup>35</sup> Adapté de DOS SANTOS PACHECO Nicolas, op. cit., n. 4  
<sup>36</sup> TOSETTI Nicolò, « Essentiel function of the alveolin network in the subpellicular microtubules and conoid assembly in Toxoplasma gondii », in *eLife*, 2020

3) La formine 1 (FRM1) se situe au pôle apical sur les anneaux pré-conoïdaux (cf. supra, Chapitre 1.2, Figure 4). Elle a un rôle indispensable dans l'invasion. Elle permet la polymérisation de l'actine de forme globulaire à filamentaire<sup>37</sup>.

4) La myosine H (MyoH) est une grande protéine, localisée sur le conoïde et désignée « moteur moléculaire » (cf. supra, Chapitre 1.2, Figure 4). Elle est dotée d'un « manche » avec à son bout une « tête »<sup>38</sup>. Elle transporte l'actine polymérisée par FRM1 du pôle apical au complexe de membrane interne en convertissant l'énergie relâchée par l'ATP en mouvement, participant ainsi à la formation du glidéosome<sup>39</sup>. Elle ne joue pas uniquement le rôle de moteur pour le transport de l'actine, mais permet également la protrusion du conoïde<sup>40</sup>.

5) La myosine A (MyoA) se situe le long du parasite entre la face externe du complexe membranaire interne (où elle est insérée grâce aux protéines GAP) et la membrane plasmique (cf. supra, Chapitre 1.2, Figure 1). Elle participe à la formation du glidéosome en se combinant à l'actine (apportée par sa consœur) et en transformant l'énergie de l'ATP en mouvement le long de celle-ci<sup>41</sup>.

6) PCR1 se situe sur les anneaux pré-conoïdaux (PCR), d'où son nom (cf. supra, Chapitre 1.2, Figure 4). Son rôle fera l'objet de la partie expérimentale (cf. infra, Chapitres 3.3 et 3.4)<sup>42</sup>.

**Polymérisation** : Réaction chimique qui unit plusieurs molécules pour en former une de masse molaire plus élevée<sup>13bis</sup>

**Actine** : Protéine musculaire qui, par une combinaison avec la protéine myosine, permet les mouvements cellulaires<sup>14bis</sup>

**ATP** : Molécule fournissant de l'énergie aux cellules<sup>15bis</sup>

<sup>37</sup> FRENAL Karine, op. cit., n. 8

<sup>38</sup> Myosine [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Myosine>, (site consulté le 20.07.2021)

<sup>39</sup> FRENAL Karine, op. cit., n. 7

<sup>40</sup> SOLDATI-FAVRE Dominique, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 19.10.2020

<sup>41</sup> FRENAL Karine, op. cit., n. 8

<sup>42</sup> SOLDATI-FAVRE Dominique, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 22.04.2021



## Chapitre 2. Mobilité et mécanismes d'invasion et de sortie de la cellule hôte

Après invasion de la cellule hôte, le parasite, à l'instar du virus, utilise pour se répliquer (que ce soit de manière sexuée ou asexuée) les **métabolites** de celle-ci, ce qui aboutit à la **lyse** de la cellule hôte et à la dissémination des nouveaux parasites. Ce type de reproduction est dénommé « cycle lytique »<sup>43</sup>.

Chez *T. gondii*, le cycle lytique correspond à la phase aiguë de la maladie. Il se déroule en 48 heures et en plusieurs étapes : l'attachement, l'invasion, la multiplication et la sortie (cf. infra, ci-dessous)<sup>44</sup>.

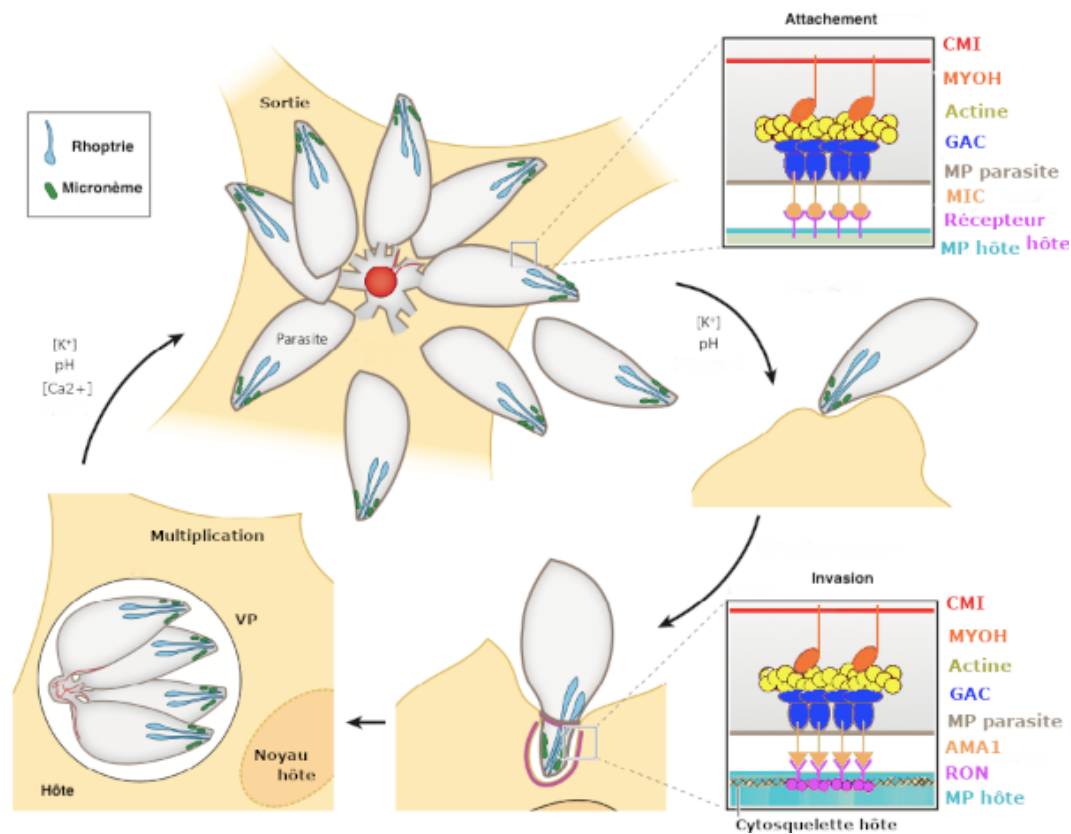


Figure 6<sup>45</sup>

**Métabolite :** Composé organique (en général des petites molécules)<sup>16bis</sup>

**Lyse :** Destruction de la membrane d'une cellule, menant à sa mort<sup>17bis</sup>

<sup>43</sup> **Cycle lytique** [en ligne], <https://www.aquaportail.com/article-286-comprendre-les-differences-entre-cycle-lytique-et-cycle-lysogenique.html>, (site consulté le 08.07.2021)

<sup>44</sup> **BISIO Hugo and SOLDATI-FAVRE Dominique**, « Signaling Cascades Governing Entry into and Exit from Host Cells by *Toxoplasma gondii* », in *Annual Review of Microbiology*, 2019

<sup>45</sup> Adapté de **BISIO Hugo and SOLDATI-FAVRE Dominique**, « Signaling Cascades Governing Entry into and Exit from Host Cells by *Toxoplasma gondii* », in *Annual Review of Microbiology*, 2019

## 2.1 L'attachement

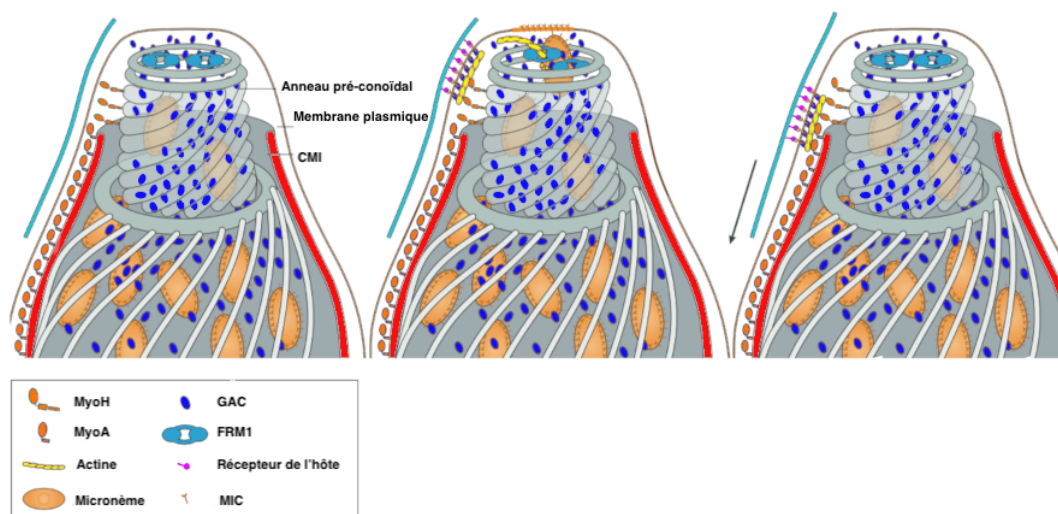


Figure 7<sup>46</sup>

Hors des cellules hôtes, le parasite est capable de se mouvoir durant plusieurs minutes et de survivre pendant plusieurs heures sous sa forme tachyzoïte<sup>47</sup>. En vue de sa survie, le toxoplasme doit donc trouver une cellule hôte dans laquelle se répliquer (ce à quoi il peut procéder dans la plupart des cellules nucléées)<sup>48</sup>.

C'est lors du premier contact avec la cellule hôte que la concentration en calcium du parasite augmente, activant une nouvelle sécrétion des adhésines MIC et AMA1 par les micronèmes au pôle apical<sup>49</sup>. MIC et AMA1 s'insèrent dans la membrane plasmique du parasite et migrent vers les côtés de celui-ci. Les MIC s'attachent ensuite à la membrane plasmique de l'hôte. Elles peuvent ainsi interagir dans le même temps avec la protéine GAC, reliées au glidéosome (du côté du parasite), et avec les récepteurs de l'hôte. Les MIC sont ensuite transportées vers l'arrière par le glidéosome, propulsant le parasite vers l'avant en le réorientant (mécanisme de mouvement de *T. gondii*). Le pôle apical du parasite est alors positionné contre la membrane de la cellule hôte. L'invasion peut commencer<sup>50 et 51</sup>.

<sup>46</sup> Adapté de FRENAL Karine, op. cit., n. 8

<sup>47</sup> BISIO Hugo and SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 11

<sup>48</sup> FRENAL Karine et SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 4

<sup>49</sup> DOS SANTOS PACHECO Nicolas, op. cit., n. 4

<sup>50</sup> FRENAL Karine, op. cit., n. 8

<sup>51</sup> BISIO Hugo and SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 11



## 2.2 L'invasion

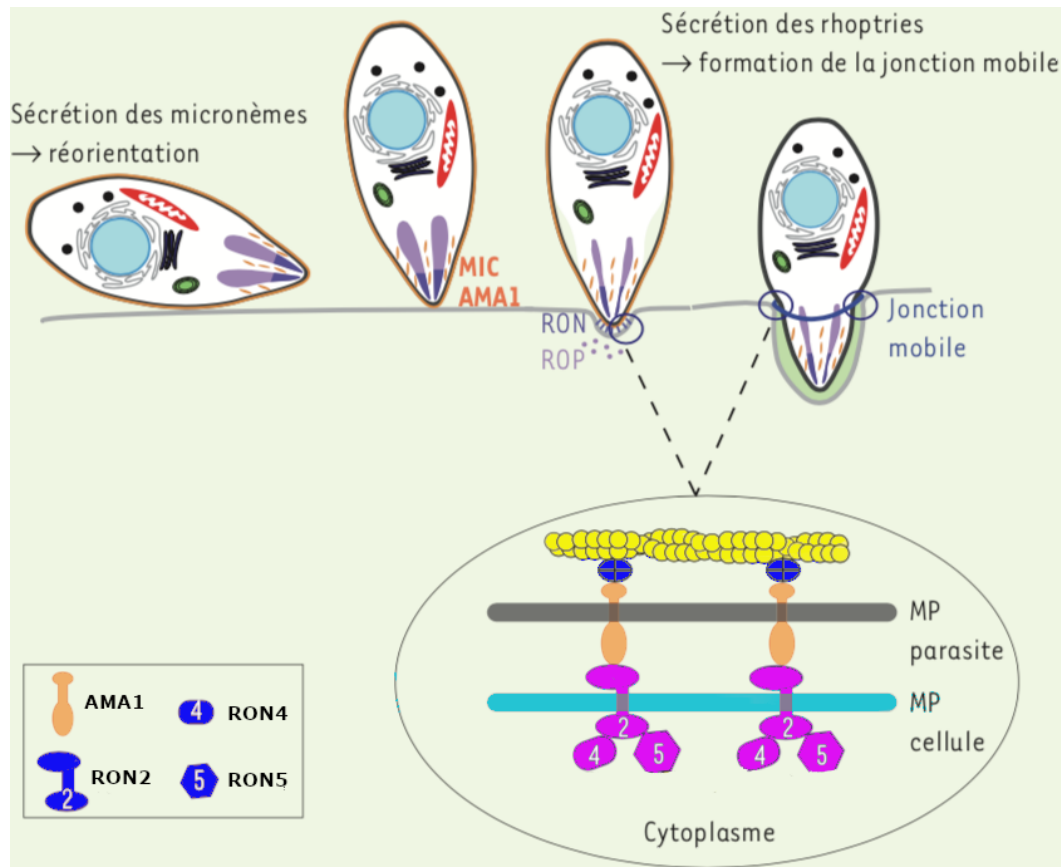


Figure 8<sup>52</sup>

Le mécanisme d'invasion s'opère par un système de jonction mobile. Cette dernière facilite l'invasion en servant d'ancrage entre les membranes plasmiques du parasite et de l'hôte. Elle est formée par les trois protéines RON2, RON4 et RON5 et par l'adhésine AMA1 (spécifique à l'invasion). Une fois sécrétée lors du contact parasite/hôte, AMA1 reste dans la membrane plasmique du parasite et rejoint le complexe apical lors de l'invasion. RON4 et RON5 se situent entre la membrane plasmique de l'hôte et son cytosquelette avec lequel elles interagissent. RON2 s'insère dans la membrane plasmique de la cellule hôte et interagit à la fois avec avec RON4, RON5 et AMA1, laquelle est insérée dans la membrane plasmique du toxoplasme<sup>53</sup>. L'action de la myosine sur l'actine déplace l'AMA1 et les autres composants de la jonction mobile vers l'arrière. Le parasite est alors propulsé vers l'avant à l'intérieur de la cellule hôte. A l'intérieur, le parasite forme un compartiment intracellulaire, désigné la vacuole parasitophore, grâce à l'invagination de la membrane plasmique de l'hôte et au matériel membranaire sécrété par le parasite. Cette vacuole lui permet d'utiliser les ressources de la cellule tout en se mettant à l'abri du système immunitaire et des défenses de la cellule hôte pour se multiplier<sup>54 et 55</sup>.

<sup>52</sup> Adapté de FRENAL Karine et SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 4

<sup>53</sup> *ibid.*

<sup>54</sup> FRENAL Karine et SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 4

<sup>55</sup> BISIO Hugo and SOLDATI-FAVRE Dominique, op. cit., n. 11

## 2.3 La multiplication intracellulaire et la sortie

Lorsque l'invasion a pris fin, le parasite se réplique jusqu'à ce que les nutriments viennent à manquer ou que le système immunitaire de l'hôte le détecte, mettant ainsi sa survie en danger. Il en est averti par une cascade de signaux d'alarme, provenant de l'environnement de la cellule hôte, qui lui transmet le message de quitter la cellule et d'en trouver une autre pour se répliquer<sup>56</sup>.

Trois signaux principaux sont connus : une diminution de la concentration de potassium ou du pH et une augmentation du calcium. Donnons l'exemple d'un macrophage qui perce la membrane d'une cellule infectée, ce qui a pour effet de faire baisser radicalement la concentration de potassium, signalant au parasite qu'il est en danger et induisant sa sortie de la cellule. De récentes études mettent en lumière la possibilité de l'existence de signaux d'alarme internes au parasite. L'origine de ces signaux reste floue à ce jour<sup>57</sup>. Une fois les signaux perçus, les micronèmes sécrètent les protéines discutées ci-avant, le glidésosome s'active, le conoïde « protlude » et le parasite se sépare des autres parasites et s'allonge. Il sort de la cellule hôte grâce à la force de propulsion du glidésosome (citée plus haut). La sortie du parasite mène à la lyse des membranes de la vacuole parasitophore et de la cellule hôte<sup>58</sup>.

## Chapitre 3. Partie expérimentale<sup>59</sup>

L'étude du mécanisme d'invasion chez le toxoplasme met en évidence une contribution du conoïde qui reste encore énigmatique. Lorsque les parasites sont mobiles, soit au moment clé de la sortie de l'hôte et durant l'invasion, le conoïde « protlude » à la pointe du parasite qui entre en contact avec la cellule hôte. Les protéines sécrétées par les micronèmes et les rhoptries se fraient un passage à travers le conoïde et les filaments d'actine sont produits au niveau de celui-ci. Tout semble indiquer que la protrusion du conoïde joue un rôle important dans l'invasion et la sortie sans que les causes et les conséquences en soient connues<sup>60</sup>.

Les expériences réalisées dans ce projet avaient pour objectifs d'analyser le rôle du conoïde, en faisant appel à des parasites transgéniques permettant d'interférer avec sa protrusion et d'en mesurer les conséquences sur la mobilité du parasite et sa capacité à entrer et sortir de la cellule hôte.

---

<sup>56</sup> **BISIO Hugo and SOLDATI-FAVRE Dominique**, op. cit., n. 11

<sup>57</sup> *ibid.*

<sup>58</sup> **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, op. cit., n. 4

<sup>59</sup> Réalisée dans le laboratoire de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** au CMU lors du stage de l'auteur de ce travail effectué du 6 au 9 avril 2021

<sup>60</sup> **SOLDATI-FAVRE Dominique**, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 17.03.2021

La méthode utilisée pour la manipulation génétique des parasites consiste en un système de contrôle inductible de l'expression des gènes qui permet la déstabilisation de différentes protéines situées aux alentours du conoïde et plus spécifiquement de la protéine de l'anneau pré-conoïdal 1 (PCR1)<sup>61</sup> et ensuite d'observer les conséquences phénotypiques qui en résultent sur le comportement du parasite ainsi modifié.

Cette méthode permet de dégrader les protéines étudiées de façon conditionnelle, et ainsi de préserver la viabilité des souches mutées. A l'aide de **ciseaux moléculaires**, il est ajouté à la protéine un « bout », le **Dégron** (auxin induced degradation AID). Ce bout de protéine, à lui seul, n'a pas d'impact significatif sur le fonctionnement du parasite, hormis lors de l'ajout de l'**auxine**, laquelle se lie au « bout » de Dégron, ce qui a pour effet de dégrader la protéine en question, processus désigné par le terme « knock-down » ou déstabilisation. En présence du Dégron, le parasite se réplique normalement en produisant des cellules-filles contenant la protéine d'intérêt. Lorsque l'auxine est introduite, le parasite continue à se répliquer, mais les cellules-filles issues de la réplication ne contiennent plus la protéine. Ce système permet une grande liberté puisque l'ajout de l'auxine peut intervenir à n'importe quel moment et qu'elle n'a aucun impact sur le fonctionnement du parasite non-modifié, soit sans Dégron<sup>62</sup>.

Cette méthode est identique à celle de la dégradation des cellules humaines. Dans le corps humain, les cellules sont dégradées dans le **protéasome**, où elles entrent puis sortent sous forme d'acide aminé. Lorsque l'une d'elles fonctionne mal, le corps le signale par un « drapeau », connu par les autres cellules, lesquelles transportent la cellule malade au protéasome. Le système de contrôle inductible de l'expression des gènes est similaire : lorsque l'auxine se lie au Dégron, elle est reconnue comme devant être dégradée et dirigée au protéasome<sup>63</sup>.

Cette technique de contrôle inductible de l'expression des gènes a l'avantage de permettre de choisir le moment opportun durant lequel la protéine est supprimée, à savoir, dans notre cas, après l'entrée du parasite dans la cellule hôte et sa réplication. Une méthode plus simple, désignée « knock-out », consiste (également à l'aide de ciseaux moléculaires) à enlever le gène du **génome**. Cette approche est uniquement possible pour les gènes non-essentiels à la survie des parasites. L'utilisation de cette technique plus simple, avant l'entrée du parasite dans la cellule hôte, empêcherait cette entrée (comme nous le constaterons dans la partie expérimentale ci-dessous) et rendrait l'expérience inutile, puisque le but de celle-ci est de constater les conséquences de l'absence de la protéine lors de la réplication et de la sortie du parasite de la cellule hôte<sup>64</sup>.

Les expériences ont été réalisées suivant les quatre phases présentées ci-dessous.

**Ciseaux moléculaires** : Protéine bactérienne (Cas9) permettant de couper spécifiquement l'ADN<sup>18bis</sup>

**Dégron** : Partie de protéine permettant la dégradation de celle-ci<sup>19bis</sup>

**Auxine** : Hormone d'origine végétale<sup>20bis</sup>

**Protéasome** : Complexe enzymatique présent chez les eucaryotes permettant la dégradation de protéines<sup>21bis</sup>

**Génome** : Matériel génétique contenant les gènes codant des protéines<sup>22bis</sup>

<sup>61</sup> **SOLDATI-FAVRE Dominique**, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 17.03.2021

<sup>62</sup> *ibid.*, interview le 17.03.2021

<sup>63</sup> *ibid.*, interview le 17.03.2021

<sup>64</sup> *ibid.*, interview le 17.03.2021

### 3.1 Mise en culture <sup>65</sup>

Les quatre parasites tests suivants sont mis en culture :

- 1) Parasite non-modifié **Wild type -Auxine** [*ie sans auxine*]
- 2) Parasite non-modifié **Wild type +Auxine** [*ie avec auxine*]
- 3) Parasite modifié **PCR1-tag-AID -Auxine** [*ie avec ajout d'un tag HA (cf. infra, Chapitre 3.2) et du Dégron, sans auxine*]
- 4) Parasite modifié **PCR1-tag-AID +Auxine** [*ie avec ajout d'un tag HA, du Dégron et d'auxine*]

**Wild type -Auxine** et **Wild type +Auxine** sont les parasites de contrôle. Ils montrent que les parasites modifiés agissent différemment en raison de leurs modifications et non pas en raison d'un paramètre indépendant de l'expérience. **Wild type +Auxine** permet de contrôler l'impact de l'auxine sans la présence du Dégron sur la protéine d'intérêt.

**PCR1-tag-AID -Auxine** est également un parasite de contrôle (bien qu'il soit modifié) dans la mesure où il permet de vérifier que l'ajout du Dégron est sans conséquence en l'absence de l'auxine.

**PCR1-tag-AID +Auxine** est le parasite modifié qui permet d'évaluer l'impact de la dégradation de la protéine d'intérêt.

Les quatre parasites non-modifiés et modifiés sans auxine sont placés dans des boîtes de Pétri avec des cellules hôtes (fibroblastes : cellules du tissu conjonctif du prépuce humain) dans lesquelles ils se sont multipliés et dont ils sont sortis depuis peu. Afin de faciliter l'observation, seule une partie des parasites est conservée, diluée (x10) et déposée dans un nouveau milieu nutritif (fibroblastes).

Les boîtes de Pétri sont laissées au repos durant 30 heures. Durant cette phase, après environ 7 heures, durant lesquelles les parasites ont eu le temps d'envahir les cellules hôtes, l'auxine est introduite dans certains compartiments de la boîte de Pétri. Cette opération marque le début du « knock-down ». A l'échéance des 30 heures, un composé chimique (BIPPO) est introduit afin de déclencher la sortie des parasites des cellules hôtes.

---

<sup>65</sup> **MARQ Jean-Baptiste**, Membre du groupe de recherche de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 06.04.2021

### 3.2 « Western Blot »<sup>66</sup>

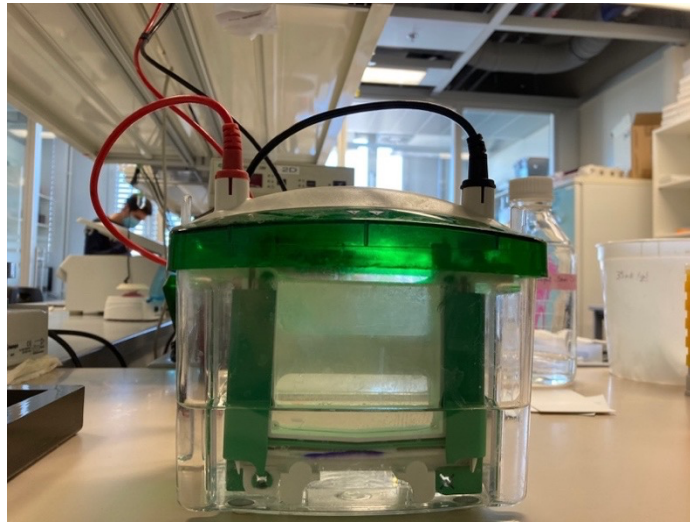


Figure 9<sup>67</sup>

Cette étape intervient avant l'expérience principale (« Egress Assay »). Elle a pour but de vérifier que la protéine PCR1 des parasites modifiés a été dégradée par la méthode utilisée (système inductible de l'expression des gènes). La première vérification est qualitative : la taille de la protéine doit être plus grande (car le Dégron [AID] y a été ajouté). La seconde est quantitative : la protéine doit être absente.

Le Western Blot est une procédure qui démarre par la présence d'un gel d'acrylamide avec quatre « puits » où sont placés les différents lysats (« soupe de protéines ») des quatre types de parasites extracellulaires modifiés et non-modifiés (cf. supra, Chapitre 3.1). Il s'agit de parasites « cassés » avec leurs protéines. Le gel est soumis à un courant électrique qui permet de séparer les protéines selon leur taille, visibles grâce à un marqueur composé de protéines colorées ayant des poids moléculaires définis (petites protéines en bas et grandes en haut).

Les protéines d'intérêts sont ensuite détectées grâce à une technique de « double anticorps » et de luminescence. Le premier anticorps est un anticorps de souris, reconnaissant l'épitope (désigné « HA »), qui a été ajouté sur la protéine PCR1 (cf. supra, Chapitre 3.1, parasites 3 et 4). Le deuxième anticorps est spécifique au premier et contient à son bout une enzyme (désignée HRP) qui est transformée en lumière (à l'aide d'une méthode d'ECL) rendant ainsi visible la protéine à laquelle cette enzyme s'accroche. La membrane est déposée dans une caméra CDD qui détecte la luminescence induite par le deuxième anticorps et affiche un trait noir partout où celui-ci s'est accroché permettant ainsi la localisation de PCR1.

**Épitope** : Partie d'antigène permettant sa reconnaissance par un anticorps<sup>23bis</sup>

**ECL** : Kit permettant de détecter la lumière émise par l'HRP<sup>24bis</sup>

<sup>66</sup> **MARQ Jean-Baptiste**, Membre du groupe de recherche de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 06.04.2021

<sup>67</sup> Photographie prise lors du stage de l'auteur de ce travail effectué dans le laboratoire de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** (CMU)

Afin de détecter les protéines séparées dans le gel, celles-ci sont au préalable transférées sur une membrane. La membrane est ensuite trempée dans du lait. L'action du lait bloque les protéines qui ne nous intéressent pas (« blocking ») en se fixant sur celles qui présentent une légère spécificité aux anticorps choisis. Les deux anticorps sont ensuite appliqués. Ceux-ci se déposent seulement sur les protéines qui présentent une grande spécificité aux anticorps (*ie* PCR1).

Résultats et conclusion :

Les deux premiers puits ne donnent aucun signal. Ils contiennent **Wild type - Auxine** et **Wild type +Auxine** où l'ajout du tag HA sur la protéine PCR1 n'a pas été effectué, ne permettant pas à l'anticorps de se fixer. La photographie prise par la camera affiche une bande noire au niveau du troisième puit. Celui-ci contient **PCR1-tag-AID -Auxine** où l'ajout du tag HA et l'absence d'auxine permet de détecter la protéine PCR1 plus grande que la normale (vérification qualitative). Le dernier puit contient **PCR1-tag-AID +Auxine**. Il n'affiche pas de bande noire, ce qui confirme que la protéine PCR1 taguée, en présence d'auxine, est effectivement dégradée (vérification quantitative).

Le deuxième signal (bande noire présente dans chacun des quatre puits) permet de valider les résultats obtenus ci-dessus. En effet, ceux-ci peuvent être biaisés en n'ajoutant pas ou moins de protéines dans les puits. Les anticorps se fixent sur la catalase, une protéine présente chez les quatre parasites. La bande noire atteste donc du fait que la même quantité de parasites a été chargée dans les quatre puits.

L'expérience permet de conclure que la méthode utilisée (système inductible de l'expression des gènes) fonctionne et permet la dégradation de la protéine d'intérêt (PCR1).

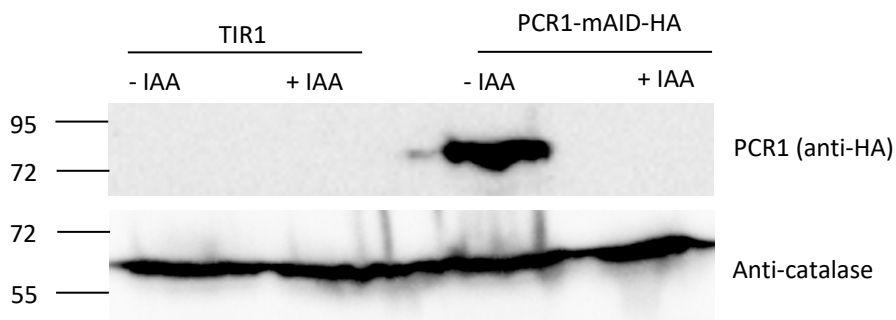


Figure 10<sup>68</sup>

<sup>68</sup> Résultats obtenus et mis en forme lors du stage de l'auteur de ce travail effectué du 6 au 9 avril 2021 dans le laboratoire de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** (CMU)

### 3.3 « Egress Assay »<sup>69</sup> (expérience principale)

Le but de cette expérience est d'observer au microscope les effets résultant de la perte de la protéine PCR1 grâce à la fusion du Dégron à celle-ci et de l'incubation des parasites en présence d'auxine. En particulier, il s'agit de vérifier si les parasites modifiés sont capables de sortir des cellules hôtes en réponse à un signal d'alarme.

Deux nouveaux composés chimiques sont intégrés à cette expérience : le BIPPO et le DMSO. Ils sont ajoutés dans les compartiments de la boîte de Pétri ci-dessous et désignés par (B) et (D). Le BIPPO agit comme un signal d'alarme sur les parasites et induit leur sortie de la cellule hôte. Le DMSO sert de solvant pour dissoudre le BIPPO. Il est donc inclus uniquement comme contrôle pour s'assurer qu'il n'impacte pas sur la viabilité des parasites (pas de stimulation des parasites).

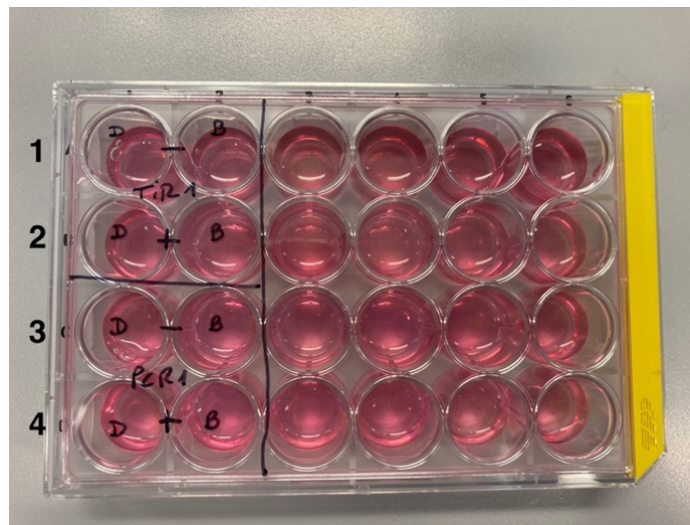


Figure 11<sup>70</sup> : Culture des quatre types de parasites non-modifiés [**Wild type - Auxine** (1) et **Wild type +Auxine** (2)] et modifiés [**PCR1-tag-AID -Auxine** (3) et **PCR1-tag-AID -Auxine** (4)]

Comme dans le Western Blot, la méthode consiste à procéder à un blocage (saturation des liaisons non-spécifiques) puis un double ajout d'anticorps (cf. supra, Chapitre 3.2), possible après l'ajout d'un détergent (PBS-Triton X-100), lequel rend la membrane des parasites perméable aux anticorps.

Les parasites sont ensuite « montés » à l'aide d'un milieu servant à les ancrer sur une lamelle en verre (coverslip). Ceux-ci sont laissés au repos puis examinés au microscope.

<sup>69</sup> HAASE Romuald, Membre du groupe de recherche de la Prof. SOLDATI-FAVRE au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 7 et 8 avril 2021

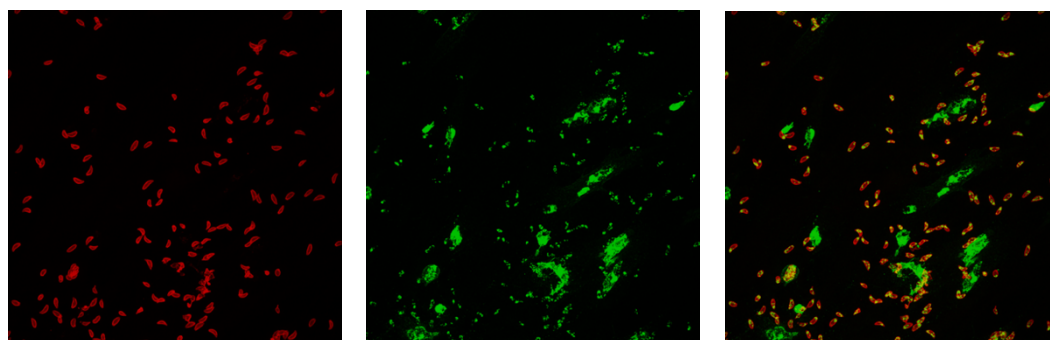
<sup>70</sup> Photographie prise lors du stage de l'auteur de ce travail effectué dans le laboratoire de la Prof. SOLDATI-FAVRE (CMU) le 06.04.2021



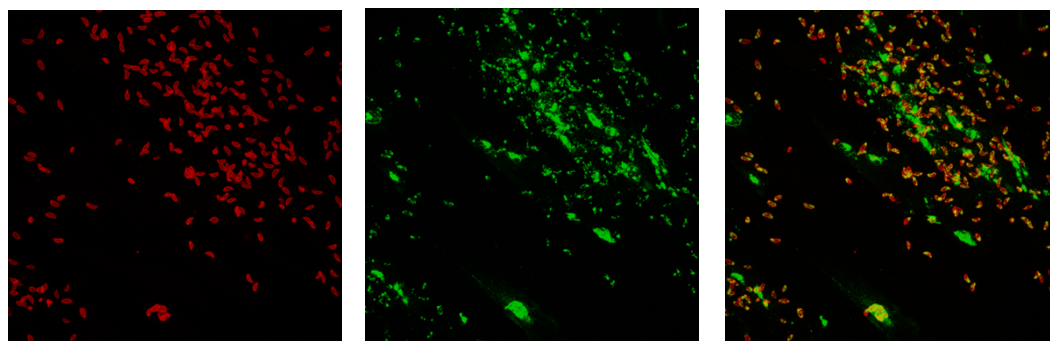
### Résultats et conclusion :

Les anticorps ajoutés sur les parasites fixés permettent d'observer ces derniers sous trois angles : (1) la membrane plasmique, ce qui permet d'observer la forme du parasite (cf. infra, anticorps en rouge), (2) les vacuoles qui entourent le parasite et les organites de ce dernier (cf. infra, anticorps en vert) et (3) la superposition des deux (cf. infra, anticorps en vert et rouge). Ces trois angles font chacun l'objet d'une image dans les cinq lignes de résultats ci-dessous<sup>71</sup>.

Comme on peut le constater dans la première ligne d'images ci-dessous, le parasite non-modifié **Wild type -Auxine BIPPO** (1) (en rouge) est capable de sortir des cellules hôtes et les vacuoles parasitophores sont lysées (en vert).



Le parasite non-modifié **Wild type +Auxin BIPPO** (2) n'est pas affecté, comme le montre la deuxième ligne d'images ci-dessous (même si les parasites sont en présence d'auxine, le Dégron n'a pas été ajouté ; l'ajout d'auxine n'a donc aucune conséquence).

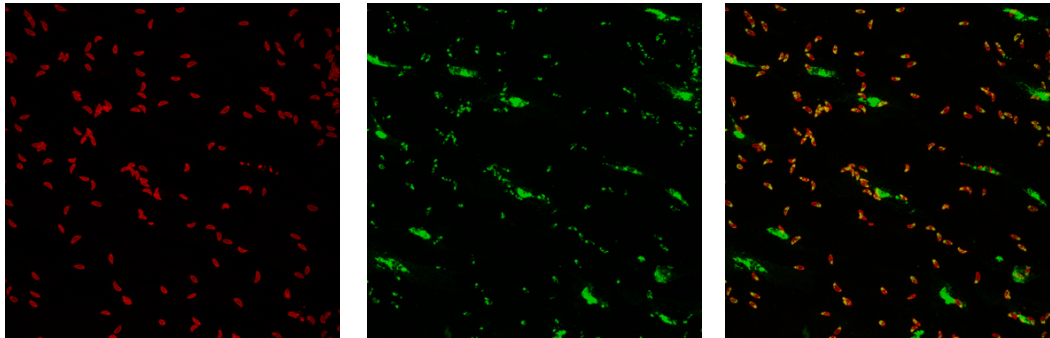


---

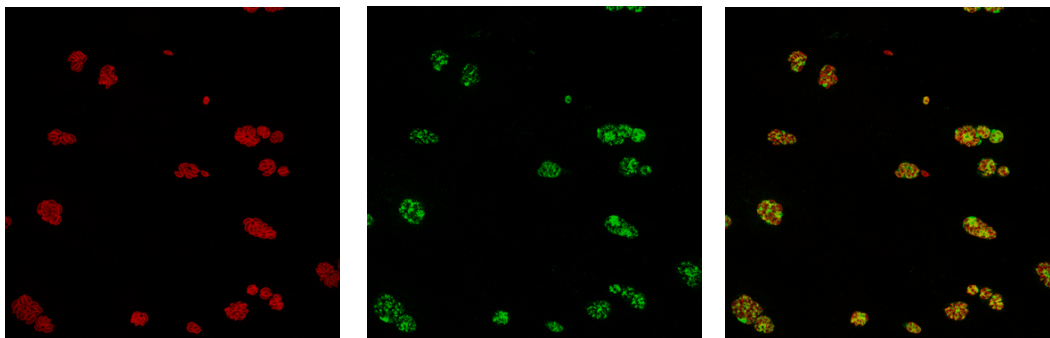
<sup>71</sup> Photographies prises lors du stage de l'auteur de ce travail effectué du 6 au 9 avril 2021 dans le laboratoire de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** (CMU)



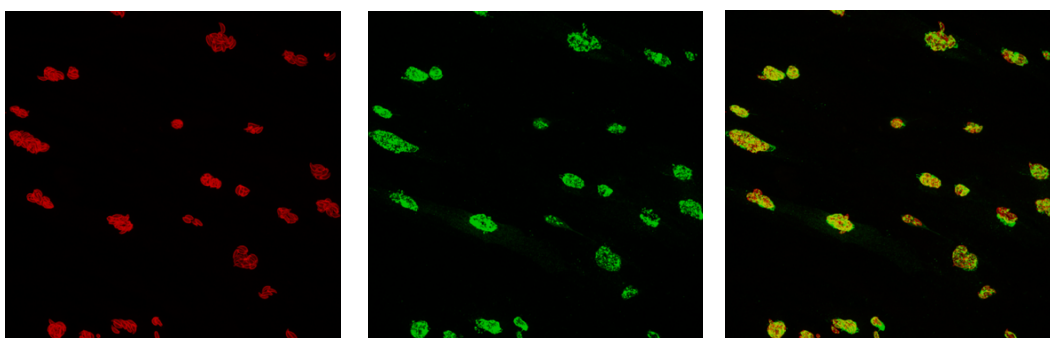
Le parasite modifié **PCR1-tag-AID -Auxine BIPPO** (3) est capable de sortir de la cellule hôte également, ce qui se constate dans la troisième ligne ci-dessous (même si cette fois-ci l'AID est ajouté, les parasites ne sont pas en présence d'auxine ; le Dégron seul n'a pas d'effet sur la sortie des parasites).



Le parasite modifié **PCR1-tag-AID+Auxine BIPPO** (4) n'est pas capable de sortir de la cellule hôte, comme il ressort de la quatrième ligne d'images ci-dessous. Il s'agit des résultats les plus importants. Les parasites sont en présence de l'auxine, du Dégron et du signal d'alarme (BIPPO). La protéine PCR1 a été supprimée et malgré l'induction de la sortie, les parasites demeurent à l'intérieur de la vacuole. La suppression de la protéine d'intérêt a empêché leur sortie lors du signal d'alarme, ce qui met en évidence le rôle crucial de cette protéine lors des mécanismes de sortie. Il reste à déterminer plus précisément sa fonction, ce qui fera l'objet de développements plus bas.



Comme il découle enfin des trois dernières images ci-dessous, sans l'addition de BIPPO, les quatre types de parasites de contrôle (DMSO ajouté) ne sortent pas de la cellule hôte, car ils ne sont pas stimulés (absence de signal d'alarme). Ce test permet de démontrer que les résultats obtenus dans cette expérience sont induits par la modification des parasites et non par l'ajout de DMSO. En effet, l'auxine et le BIPPO ajoutés aux parasites sont dilués dans du DMSO. Les parasites de contrôle (avec DMSO) permettent de vérifier que le DMSO n'a pas d'effet sur les parasites



Les résultats de cette expérience peuvent également être exprimés sous la forme suivante, de façon plus complète et précise :

		SANS AUXINE (avec BIPPO)	AVEC AUXINE (avec BIPPO)
Parasite Wild type	Intacte	15	20
	Lysée	95	92
Parasite PCR1-tag-AID	Intacte	3	126
	Lysée	98	4

Figure 12 : Nombre de vacuoles parasitaires intactes et lysées avec/sans auxine

	SANS AUXINE (avec BIPPO)	AVEC AUXINE (avec BIPPO)
Parasite Wild type	86,36%	82,14%
Parasite PCR1-tag-AID	97,03%	3,08%

Figure 13 : Pourcentage de vacuoles parasitaires lysées avec/sans auxine

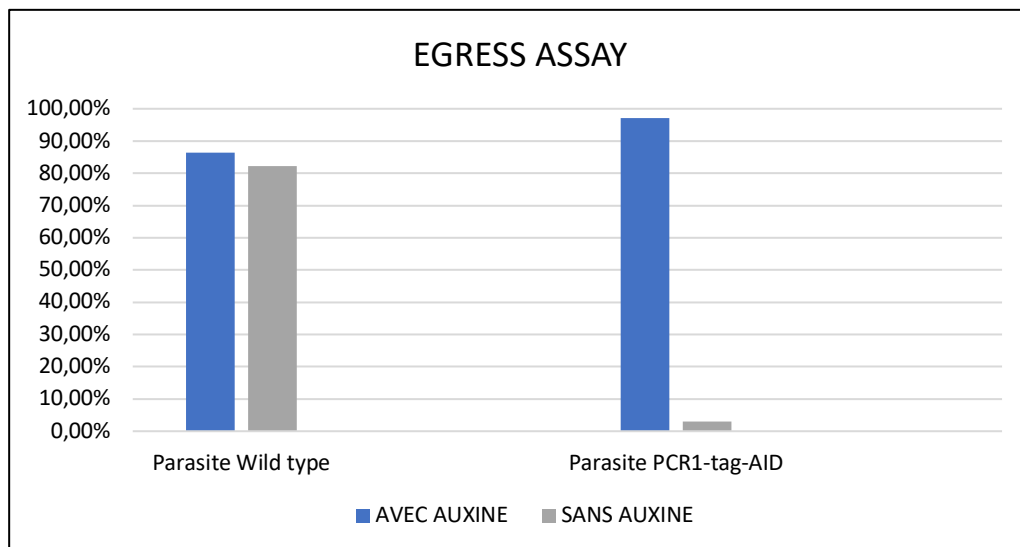


Figure 14 : Pourcentage de vacuoles parasitaires lysées avec/sans auxine

### 3.4 « Ultrastructure expansion microscopy »<sup>72</sup>

Le but de cette expérience est de déterminer si le conoïde est capable de « protruder » après la déstabilisation de six protéines différentes.

Le protocole de cette expérience étant long et complexe, il ne sera pas décrit ici, hormis ce qui suit.

Les six groupes de parasites examinés ont été modifiés grâce au système de contrôle inductible de l'expression des gènes. Ils ont chacun subi le « knock-down » du gène codant pour une des six protéines suivantes : AC 9, AC 10, MyoH, MyoA, FRM1 et surtout PCR1 (cf. supra, Chapitre 1.3).

Leur structure (protrusion du conoïde) est constatée en image grâce à « l'ultrastructure expansion microscopy » qui est une nouvelle technique de microscopie à fluorescence avec une haute résolution.

Cette technique permet l'observation du conoïde avec précision, ce qui était impossible jusque-là. Au vu de la taille du conoïde, l'agrandissement nécessaire à son observation entraîne la lyse du parasite par la force du laser utilisé par le microscope. « L'ultrastructure expansion microscopy » est une méthode qui, au lieu d'augmenter la puissance du microscope, agrandit l'objet observé, soit en l'occurrence le parasite et surtout son conoïde. Cet agrandissement est obtenu par la fixation des parasites modifiés et stimulés dans un gel, lequel est ensuite gonflé avec de l'eau. Ce parasite ainsi agrandi est observé au microscope<sup>73</sup>.

#### Conclusion :

L'expérience montre que la protrusion du conoïde est inhibée dans tous les groupes, à l'exception de celui des parasites n'exprimant plus la MyoA.

---

<sup>72</sup> **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, Membre du groupe de recherche de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 09.04.2021

<sup>73</sup> **Du nouveau sur le parasite de la malaria** [en ligne], <https://pages.rts.ch/la-1ere/programmes/cqfd/12-03-2021#12004126> (site consulté le 08.09.2021)

### 3.5 Synthèse des résultats

Les tableaux et images ci-après (Figures 15 à 17) résument ou illustrent les résultats de la partie expérimentale de ce travail et ceux d'autres expériences non traitées dans celui-ci.

Groupes de parasites sans les protéines suivantes :	Protrusion du conoïde	Sortie	Invasion	Mobilité	Sécrétion par les micronèmes
AC9	NA*	×	×	×	×
AC10	NA*	×	×	×	×
MyoH	×	×	×	×	✓
MyoA	✓	×	×	×	✓
FRM1	×	×	×	×	✓
PCR1	×	×	×	×	×

Figure 15 : Résultats des « knock-down » des différentes protéines

\*Non-applicable

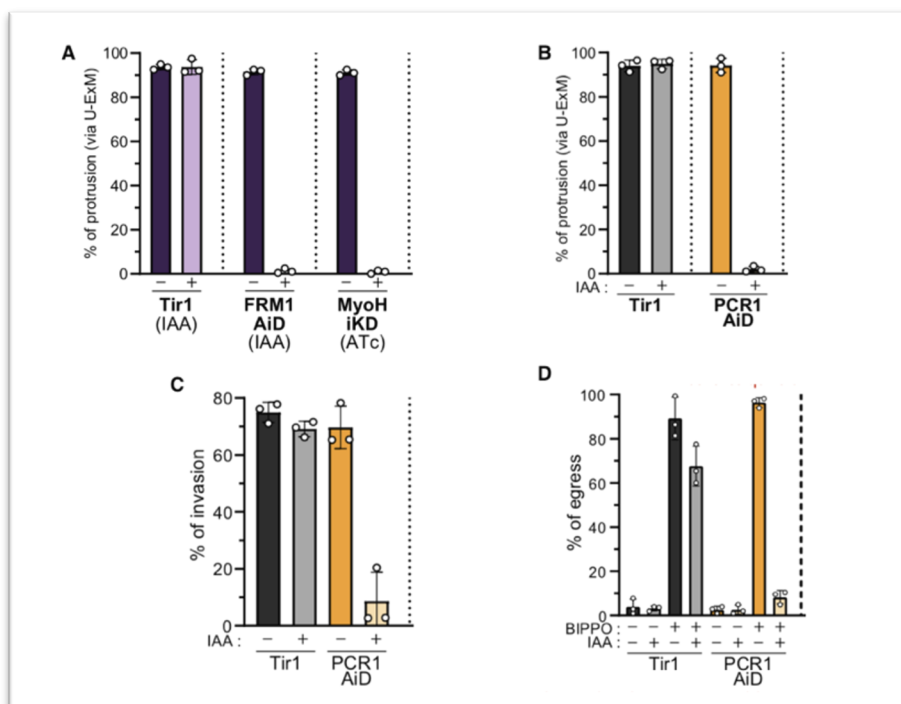


Figure 16<sup>74</sup>: Pourcentage de protrusion, d'invasion et de sortie chez des parasites modifiés et non-modifiés observés par microscopie à expansion  
 (A) et (B) Pourcentage de protrusion chez des parasites non-modifiés (Tir1) et modifiés (déstabilisation de FRM1, MyoH et PCR1) avec ou sans auxine  
 (C) Pourcentage d'invasion chez des parasites non-modifiés (Tir1) et modifiés (déstabilisation de PCR1) avec ou sans auxine  
 (D) Pourcentage de sortie chez des parasites non-modifiés (Tir1) et modifiés (PCR1) avec ou sans auxine et BIPPO

<sup>74</sup> **DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, données non encore publiées dont certaines ont été constatées lors du stage de l'auteur de ce travail effectué du 6 au 9 avril 2021 dans le laboratoire de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** (CMU)

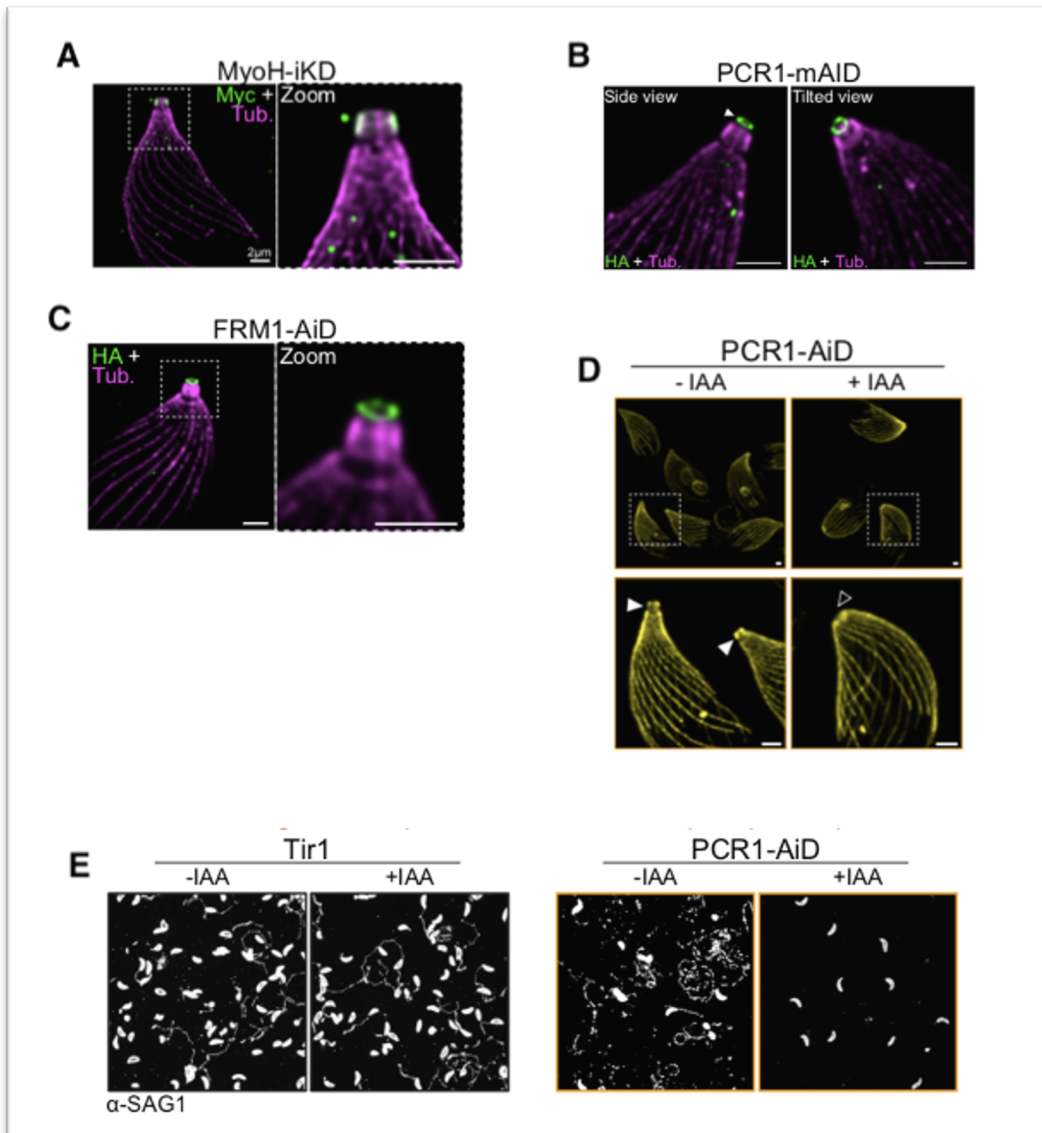


Figure 17<sup>75</sup> : Images prises par microscopie à expansion

(A) Localisation de la protéine MyoH au conoïde

(B) Localisation de la protéine PCR1 au conoïde aux anneaux pré-conoïdaux

(C) Localisation de la protéine FRM1 au conoïde aux anneaux pré-conoïdaux

(D) Test de protrusion du conoïde chez des parasites modifiés avec déstabilisation de PCR1 (à gauche sans auxine et à droite avec auxine)

(E) Test de mobilité chez des parasites non-modifiés (Tir1) et modifiés (PCR1-AiD [déstabilisation de PCR1]) sans auxine et avec auxine. Lorsque les parasites se déplacent, ils déposent derrière eux une protéine SAG1 qui forme des trainées blanches

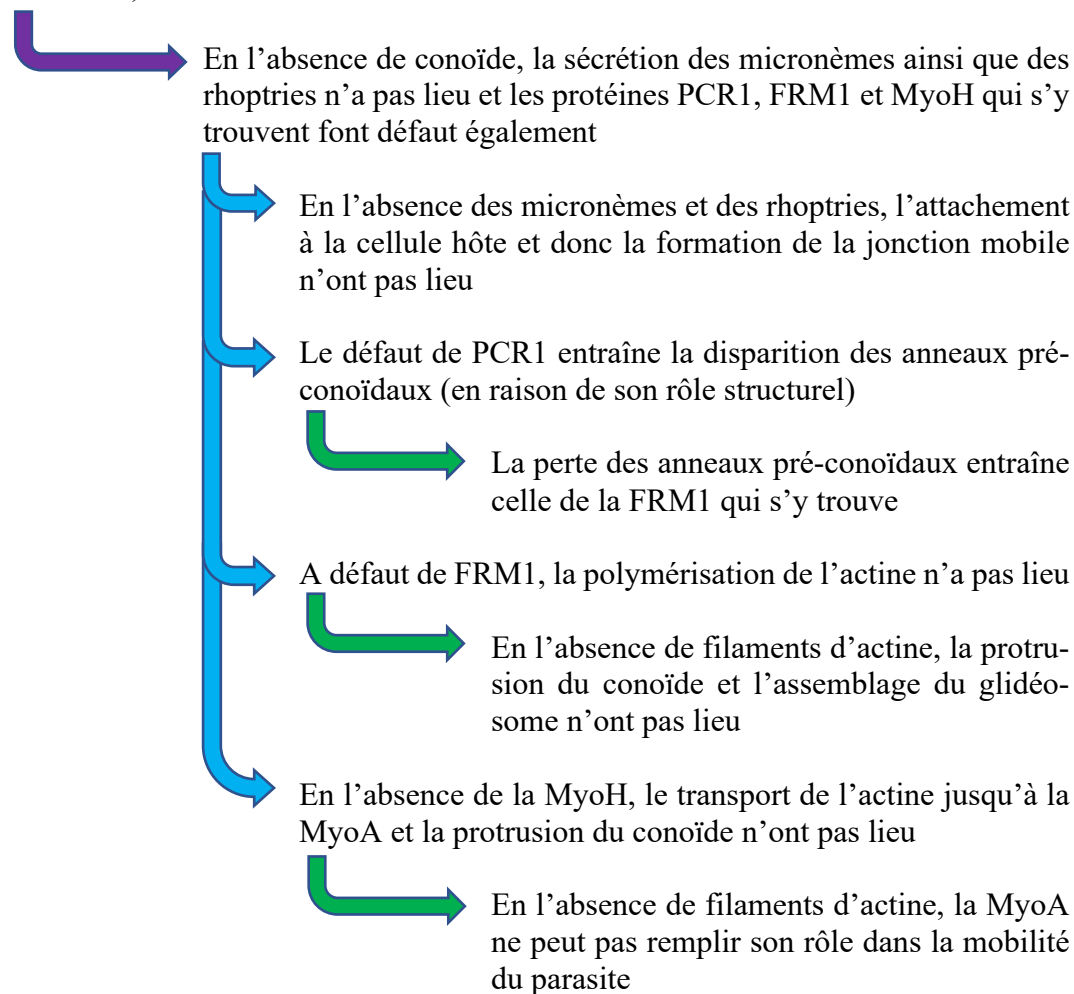
<sup>75</sup> Photographies dont certaines prises lors du stage de l'auteur de ce travail effectué du 6 au 9 avril 2021 dans le laboratoire de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** (CMU)

### 3.6 Interprétation des résultats <sup>76</sup>

Il est rappelé que le parasite a besoin d'une combinaison de protéines pour faire fonctionner le processus d'invasion, de sortie de l'hôte et de mobilité. L'on sait également que lors de ces événements, le conoïde « protreude ».

Cette partie expérimentale avait pour but de déterminer la fonction de cette protrusion et en particulier si et comment elle est liée à celle des protéines. Les résultats de cette celle-ci, résumés dans la figure 15 ci-dessus, apportent les réponses suivantes :

La suppression de AC9 et AC10 entraîne la perte du conoïde (en raison de leur rôle structurel)



Le rôle de la protrusion du conoïde n'a pas été élucidé.

Cela étant, une contribution significative de celle-ci à la sécrétion des micronèmes a été exclue (cf. supra, Chapitre 2.1, Figure 7).

<sup>76</sup> **SOLDATI-FAVRE Dominique**, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 19.08.21 et 13.09.21

Par ailleurs, le rôle clé de PCR1 dans la formation des anneaux pré-conoïdaux a été établi. Ceux-ci servent de site d'assemblage des filaments d'actine par la FRM1. La MyoH est essentielle à la protrusion du conoïde et au transport des filaments vers la MyoA. Quant à la MyoA, elle permet la mobilité du parasite grâce à son action sur les filaments d'actine (cf. supra, Chapitre 1.3 et 2.1, Figure 7).

Enfin, le résultat spécifique du groupe des parasites n'exprimant pas la MyoA (cf. supra, Chapitre 3.4, Figure 15) permet de conclure que la protrusion du conoïde ne garantit pas la capacité du parasite à envahir et sortir de la cellule hôte. Cette protrusion est nécessaire à cette fin, mais pas suffisante.

Une hypothèse quant au rôle de la protrusion du conoïde a pu être développée grâce aux résultats des expériences ci-dessus et à la découverte de la localisation précise de la FRM1, soit sur le dessous et non le dessus de l'anneau pré-conoïdal.

Selon cette hypothèse, la protrusion du conoïde permettrait le déplacement des filaments d'actine, avec le conoïde, vers le haut. Les étapes seraient les suivantes :

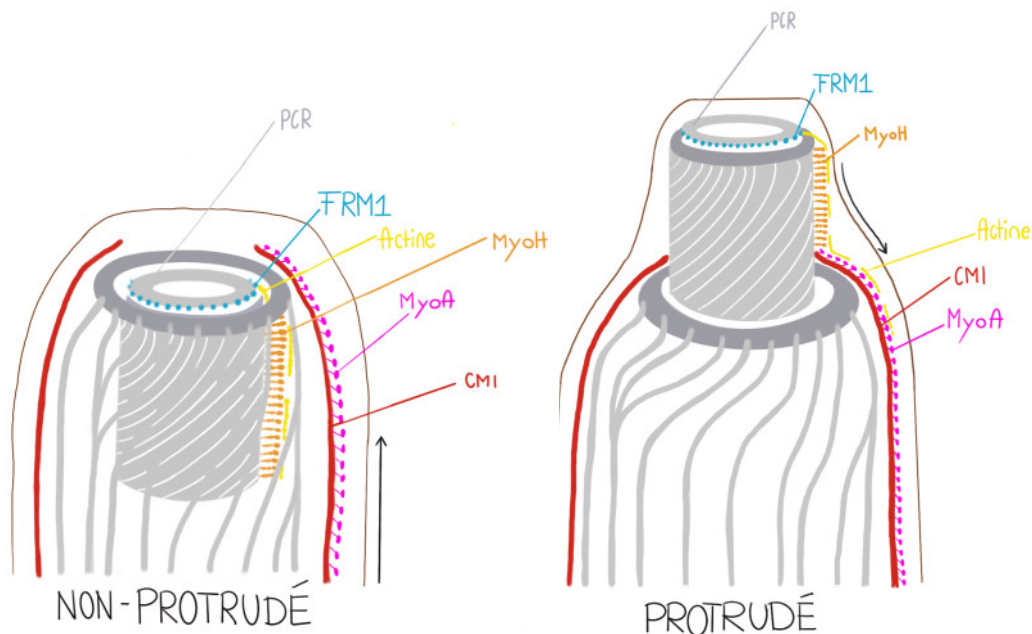


Figure 18<sup>77</sup>

L'actine serait polymérisée par la FRM1 sur le conoïde non « protrudé » à l'anneau pré-conoïdal. Les filaments d'actine glisseraient ensuite le long du conoïde vers le bas et seraient attrapés par la MyoH. Le moteur, ainsi assemblé, permettrait la protrusion du conoïde. Une fois le conoïde « protrudé », la MyoH transporterait les filaments d'actine le long du conoïde vers le bas jusqu'à la MyoA. Cette dernière l'utiliserait à son tour pour l'assemblage du glidésome rendant possible la mobilité du parasite.

<sup>77</sup> Schémas dessinés par l'auteure de ce travail

Le système de sortie, d'invasion et de mobilité du parasite serait donc actomyosine-dépendant puisqu'il nécessiterait la MyoH, la MyoA, mais également les filaments d'actine pour son fonctionnement. En d'autres termes, au vu de cette localisation de la FRM1 sur le dessous et non le dessus de l'anneau pré-conoïdal, à défaut de la protrusion du conoïde, les filaments s'actine ne pourraient être transportés là où ils doivent remplir leur rôle.

## Conclusion

L'on désigne par recherche fondamentale, les travaux expérimentaux et théoriques qui portent sur des phénomènes ou des mécanismes dans le but de les comprendre. L'objectif n'est pas d'en tirer un usage particulier, mais d'acquérir de nouvelles connaissances, menant éventuellement à une application. La recherche appliquée, quant à elle, tend à trouver une solution ou une amélioration à un problème, notamment dans le domaine de la santé publique <sup>78 et 79</sup>.

Dans le cadre de la recherche fondamentale ayant pour objet *T. gondii*, la mobilité et les mécanismes d'invasion, ainsi que de sortie de ce parasite de la cellule hôte ont été approfondis. Ces mécanismes connus ont été repris et expérimentés dans ce travail, étant relevé que les expériences effectuées se sont concentrées sur la sortie de la cellule hôte, les mécanismes d'invasion étant similaires.

En particulier, il a été constaté à nouveau que certaines protéines jouent un rôle clé dans la survie et la dissémination du parasite en tant qu'elles sont indispensables aux mécanismes précités.

Par la pratique, il a ainsi été possible de confirmer les réponses suivantes (déjà connues) aux trois questions posées dans l'introduction du présent travail :

La déstabilisation de chacune des six protéines étudiées a eu pour conséquence l'impossibilité pour le parasite de se mouvoir et d'envahir, ainsi que de sortir de la cellule hôte.

La déstabilisation de trois d'entre elles a eu pour conséquence par ailleurs l'impossibilité pour les micronèmes d'effectuer leur travail de sécrétion de certaines autres protéines.

La déstabilisation de cinq des six protéines étudiées a enfin empêché la protrusion du conoïde.

Ces réponses ne suffisent pas à élucider le rôle de la protrusion du conoïde dans l'invasion de la cellule hôte par le parasite, point qui reste en suspens à l'heure actuelle. Cela étant dit, les observations qui découlent des expériences effectuées dans ce travail permettent de poser de nouvelles hypothèses qui seront testables expérimentalement.

---

<sup>78</sup> **Recherche fondamentale** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche\\_fondamentale](https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche_fondamentale), (site consulté le 19.07.2021)

<sup>79</sup> **Recherche appliquée** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche\\_appliquée](https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche_appliquée), (site consulté le 19.07.2021)



De plus, les connaissances acquises en recherche fondamentale sur la localisation et le rôle clé de différentes protéines chez les agents infectieux, tel que *Toxoplasma gondii*, pourraient dans un futur proche être utilisées en recherche appliquée pour empêcher et/ou traiter les maladies qu'ils provoquent. Des médicaments ciblés (qui existent déjà pour certains types de cancer) inhibant certaines protéines pourraient être développés<sup>80</sup>.

En dernier lieu, il est intéressant de relever, certes sans lien avec ce travail, que selon certains chercheurs, *Toxoplasma gondii* favorise chez son hôte la présence ou le développement de caractéristiques psychologiques et comportementales, tels que l'ambition et l'entrepreneuriat<sup>81</sup>.

### **Bilan personnel**

J'ai choisi le domaine scientifique en raison de mon intérêt pour cette matière, mais également en raison de la possibilité d'être parrainée. Cela était, à mes yeux, le garant d'un travail exigeant, actuel et impliquant des contacts humains.

Dans ce cadre, j'ai ensuite choisi, par le biais des possibilités offertes par l'Académie Suisse des sciences naturelles, de solliciter Madame la Professeure Dominique Soldati-Favre, qui a accepté ma demande et m'a recommandé ce sujet.

Ce travail m'a permis de me familiariser avec le monde scientifique, en particulier de la recherche en biologie, grâce notamment au stage de quatre jours dont j'ai bénéficié dans son laboratoire. J'y ai découvert le fonctionnement d'un laboratoire et effectué les expériences décrites dans ce travail. J'ai ainsi pu mettre en pratique les connaissances théoriques acquises dans les articles scientifiques qu'elle a mis à ma disposition.

La rédaction a été la partie la plus difficile. La lecture des articles m'a énormément apporté sur ce point. Cependant, ceux-ci étant complexes, techniques et détaillés, il a fallu faire preuve de clarté et synthèse, tout en omettant aucune information utile à la compréhension. Dans ce but, afin de mettre en contexte mon exposé, j'ai été amenée à consulter un grand nombre de sources pour comprendre et décrire les phénomènes biologiques plus généraux.

En conclusion, ce travail fut une expérience enrichissante. Un premier « vrai » contact tant avec profession qu'avec la matière elle-même. J'ai pu me rendre compte des richesses de celle-ci. J'ai pu développer mes facultés à organiser les idées, à les exprimer par écrit, ainsi qu'à décrire de façon simple des concepts compliqués.

Cela avec beaucoup de plaisir et d'intérêt.

---

<sup>80</sup> **DELAHAYE-DURIEZ** *Andrée*, « Identification de cibles thérapeutiques et repositionnement de médicaments par analyses de réseaux géniques », in *Med Sci.*, vol. 35, 2019, p.515-518

<sup>81</sup> **K. JOHNSON** *Stefanie*, « Risky business: linking *Toxoplasma gondii* infection and entrepreneurship behaviours across individuals and countries », in *THE ROYAL SOCIETY publishing*, 2018

## Remerciements

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans Madame la Professeure Dominique Soldati-Favre. Je lui suis très reconnaissante d'avoir accepté de me parrainer. Je la remercie de m'avoir aiguillée sur ce sujet et donné l'opportunité d'effectuer un stage au sein de son laboratoire. Elle m'a accordé de nombreux entretiens, lors desquels elle m'a fourni toutes les explications utiles et communiqué son enthousiasme pour le sujet. Je la remercie également de sa lecture et de ses corrections. Madame la Professeure, j'ai été heureuse de réaliser ce projet si intéressant avec vous !

Je remercie évidemment ma maîtresse accompagnante, Madame Tania Buhler Garrido, de son encadrement, ses conseils et sa disponibilité.

J'adresse mes remerciements aux membres du groupe de recherche de Madame la Professeure Soldati-Favre, Jean-Baptiste Marq, Romuald Haase et Nicolas Dos Santos, qui m'ont si bien prise en charge lors de la partie expérimentale, à laquelle j'ai eu la chance de participer. Ils m'ont de plus fourni leur assistance dans la réalisation des figures illustrant les expériences. Merci de votre accueil, de votre pédagogie et de votre bonne humeur !

Je remercie également mon oncle, pour sa lecture rapide, efficace et critique durant les vacances à la mer...

Je remercie enfin chaleureusement ma mère, qui m'a accompagnée et soutenue, tout au long de ce travail, avec ses encouragements, ses idées et sa patience. Elle m'a consacré beaucoup de temps en m'apportant son aide précieuse dans la structure et la rédaction.

## Notes de bas de page du glossaire

- 1bis. **Organite** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Organite>, (site consulté le 01.08.2021)
- 2bis. **Immunosuppression** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Protozoaire>, (site consulté le 01.08.2021)
- 3bis. **Protrusion** [en ligne], <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/protrusion/64617>, (site consulté le 01.08.2021)
- 4bis. **Reproduction (biologie)** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Reproduction\\_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Reproduction_(biologie)), (site consulté le 01.08.2021)
- 5bis. **Toxoplasma gondii** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii), (site consulté le 01.08.2021)
- 6bis. **Toxoplasma gondii** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii), (site consulté le 01.08.2021)
- 7bis. **Toxoplasma gondii** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii), (site consulté le 01.08.2021)
- 8bis. **Multiplication asexuée** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Multiplication\\_asexuée](https://fr.wikipedia.org/wiki/Multiplication_asexuée), (site consulté le 01.08.2021)
- 9bis. **Toxoplasma gondii** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii), (site consulté le 01.08.2021)
- 10bis. **Membrane plasmique** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane\\_plasmique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_plasmique), (site consulté le 01.08.2021)
- 11bis. **Adhésine** [en ligne], <https://www.aquaportail.com/definition-10462-adhesine.html>, (site consulté le 01.08.2021)
- 12bis. **Expansion microscopy** [en ligne], [https://en.wikipedia.org/wiki/Expansion\\_microscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Expansion_microscopy), (site consulté le 01.08.2021)
- 13bis. **Polymérisation** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Polymérisation>, (site consulté le 01.08.2021)
- 14bis. **Actine** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Actine>, (site consulté le 01.08.2021)
- 15bis. **ATP** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Adénosine\\_triphosphate](https://fr.wikipedia.org/wiki/Adénosine_triphosphate), (site consulté le 01.08.2021)
- 16bis. **Métabolites** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Métabolite>, (site consulté le 01.08.2021)
- 17bis. **Lyse** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Lyse\\_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Lyse_(biologie)), (site consulté le 01.08.2021)
- 18bis. **Cas9** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Cas9>, (site consulté le 01.08.2021)
- 19bis. **Degron** [en ligne], <https://en.wikipedia.org/wiki/Degron>, (site consulté le 01.08.2021)
- 20bis. **Auxine** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Auxine>, (site consulté le 01.08.2021)
- 21bis. **Protéasome** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Protéasome>, (site consulté le 01.08.2021)

22bis. **Génome** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Génome>,  
(site consulté le 01.08.2021)

23bis. **Épitope** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Épitope>,  
(site consulté le 01.08.2021)

24bis. **SOLDATI-FAVRE Dominique**, Prof. au département de microbiologie et  
médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interviews les  
28.09.2021, 19.10.2020, 17.03.2021 et 22.04.2021

## Bibliographie

### 1. Sites internet

**Actine** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Actine>,  
(site consulté le 01.08.2021)

**Adhésine** [en ligne], <https://www.aquaportail.com/definition-10462-adhesine.html>, (site consulté le 01.08.2021)

**Apicomplexa** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Apicomplexa>,  
(site consulté le 13.04.2021 et 27.07.2021)

**Apicomplexé** [en ligne], <https://www.aquaportail.com/definition-14015-apicomplexe.html>, (site consulté le 27.07.2021)

**ATP** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Adénosine\\_triphosphate](https://fr.wikipedia.org/wiki/Adénosine_triphosphate),  
(site consulté le 01.08.2021)

**Auxine** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Auxine>,  
(site consulté le 01.08.2021)

**Bactérie** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Bactérie>,  
(site consulté le 03.07.2021)

**Cas9** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Cas9>,  
(site consulté le 01.08.2021)

**Cycle lysogénique** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle\\_lytique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_lytique),  
(site consulté le 08.07.2021)

**Cycle lytique** [en ligne], <https://www.aquaportail.com/article-286-comprendre-les-differences-entre-cycle-lytique-et-cycle-lysogenique.html>,  
(site consulté le 08.07.2021)

**Dégron** [en ligne], <https://en.wikipedia.org/wiki/Degron>,  
(site consulté le 01.08.2021)

**Du nouveau sur le parasite de la malaria** [en ligne], <https://pages.rts.ch/lalere/programmes/cqfd/12-03-2021#12004126>  
(site consulté le 08.09.2021)

**Épitope** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Épitope>,  
(site consulté le 01.08.2021)

**Expansion microscopy** [en ligne], [https://en.wikipedia.org/wiki/Expansion\\_microscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Expansion_microscopy), (site consulté le 01.08.2021)

**Génome** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Génome>,  
(site consulté le 01.08.2021)

**Immunosuppression** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Protozoaire>, (site consulté le 01.08.2021)

**Lyse** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Lyse\\_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Lyse_(biologie)), (site consulté le 01.08.2021)

**Maladie infectieuse** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Maladie\\_infectieuse](https://fr.wikipedia.org/wiki/Maladie_infectieuse), (site consulté le 03.07.2021)

**Membrane plasmique** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane\\_plasmique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_plasmique), (site consulté le 01.08.2021)

**Métabolites** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Métabolite>, (site consulté le 01.08.2021)

**Multiplification asexuée** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Multiplification\\_asexuée](https://fr.wikipedia.org/wiki/Multiplification_asexuée), (site consulté le 01.08.2021)

**Myosine** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Myosine>, (site consulté le 20.07.2021)

**Organite** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Organite>, (site consulté le 01.08.2021)

**Parasite, champignon, bactérie et virus : quelles différences ?** [en ligne], <https://www.mediachimie.org/actualite/parasite-champignon-bacterie-et-virus-queelles-differences>, (site consulté le 03.07.2021)

**Polymérisation** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Polymérisation>, (site consulté le 01.08.2021)

**Présentation des infections mycosiques** [en ligne], <https://www.msdmannuals.com/fr/accueil/infections/infections-mycosiques/présentation-des-infections-mycosiques>, (site consulté le 03.07.2021)

**Présentation des infections mycosiques** [en ligne], <https://www.msdmannuals.com/fr/accueil/infections/infections-mycosiques/présentation-des-infections-mycosiques>, (site consulté le 03.07.2021)

**Prise en charge des infections parasitaires** [en ligne], <https://www.msdmannuals.com/fr/professionnel/maladies-infectieuses/prise-en-charge-des-infections-parasitaires/prise-en-charge-des-infections-parasitaires>, (site consulté le 03.07.2021)

**Protéasome** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Protéasome>, (site consulté le 01.08.2021)

**Protrusion** [en ligne], <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/protrusion/64617>, (site consulté le 01.08.2021)

**Recherche appliquée** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche\\_appliquée](https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche_appliquée), (site consulté le 19.07.2021)

**Recherche fondamentale** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche\\_fondamentale](https://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche_fondamentale), (site consulté le 19.07.2021)

**Reproduction (biologie)** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Reproduction\\_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Reproduction_(biologie)), (site consulté le 01.08.2021)

**Toxoplasma gondii** [en ligne], [https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\\_gondii](https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii), (site consulté les 01.08.2021, 06.04.2021, 13.04.2021 et 22.07.2021)

**Toxoplasmose** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasmose>,  
(site consulté le 06.07.2021)

**Virus** [en ligne], <https://fr.wikipedia.org/wiki/Virus>,  
(site consulté le 03.07.2021)

## 2. Interviews

**DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, Membre du groupe de recherche de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 09.04.2021

**HAASE Romuald**, Membre du groupe de recherche de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interviews les 7 et 8 avril 2021

**MARQ Jean-Baptiste**, Membre du groupe de recherche de la Prof. **SOLDATI-FAVRE** au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interview le 06.04.2021

**SOLDATI-FAVRE Dominique**, Prof. au département de microbiologie et médecine moléculaire à la Faculté de médecine de Genève, interviews les 19.10.2020, 17.03.2021, 22.04.2021, 19.08.2021, 13.09.2021 et 28.09.2021

## 3. Articles de périodiques

**BISIO Hugo and SOLDATI-FAVRE Dominique**, « Signaling Cascades Governing Entry into and Exit from Host Cells by *Toxoplasma gondii* », in *Annual Review of Microbiology*, 2019

**DELAHAYE-DURIEZ Andrée**, « Identification de cibles thérapeutiques et repositionnement de médicaments par analyses de réseaux géniques », in *Med Sci.*, vol. 35, 2019, p.515-518

**DOS SANTOS PACHECO Nicolas**, « Evolution, composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa », in *Cell Press reviews*, 2003

**FRENAL Karine et SOLDATI-FAVRE Dominique**, « Un complexe moléculaire unique à l'origine de la mobilité et de l'invasion des Apicomplexes », in *Médecine/Sciences*, vol.29, 2013, no.5, p.515-22

**FRENAL Karine**, « Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa », in *Nature reviews*, vol.15, 2017

**TOSETTI Nicolò**, « Essential function of the alveolin network in the subpellicular microtubules and conoid assembly in *Toxoplasma gondii* », in *eLife*, 2020

**K. JOHNSON Stefanie**, « Risky business: linking *Toxoplasma gondii* infection and entrepreneurship behaviours across individuals and countries », in *THE ROYAL SOCIETY publishing*, 20