République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

Isolement et caractérisation génétique de *Toxoplasma gondii* chez le chat en Algérie

Présentée par : Yekkour Feriel

Soutenue publiquement le 21 Octobre 2017

Les membres du jury :

Président	Pr. KHELAF Djamel	Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger
Examinatrice	Pr. GHALMI Farida	Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger
Examinateur	Dr. OUCHENE Nassim	Institut des Sciences Vétérinaires de Blida
Examinatrice	Pr. CHEKIRI-TALBI Mey	Faculté de Médecine, Université de Blida 1
Directrice de thèse	Pr. BOUCHENE Zahida	Faculté de Médecine d'Alger
Co-directrice de thèse	Pr. AIT-OUDHIA Khatima	Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Année universitaire : 2016/2017

Dédicace

A mes très chers Parents…

Comment parler de moi sans parler de vous, mes chers parents je vous dois tant. Et c'est pour cette raison que je débute en vous remerciant. Tous les mots ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements, votre soutien, et vos prières, que je me suis réalisée. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle pour toute l'affection que vous n'avez jamais cessé de me prodiguer. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de ma vie

A mon Mari Maamar…

Tes sacrifices, ton soutien moral, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que dieu te protège et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.

A ma fille Maria…

Qui m'a donné la joie et le courage, pour venir à bout de ce travail, je lui souhaite une longue vie pleine de succès et de réussite prés de tous ceux qui lui sont chèrs.

A mon frère Amine, qui m'a toujours bien orientée dans les moments difficiles. Merci pour ton soutient.

A tous ceux que j'ai oublié de citer, qui ont participé de loin ou de près à la concrétisation de ce modeste travail.

Feriel Yekkour

Remerciements

Au terme de ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur Bouchene-Bouabid Zahida ; chef de service du laboratoire « mère et enfant », CHU Beni Messous d'Alger, qui en dépit de ses responsabilités a bien voulu m'encadrer, me conseiller et m'encourager, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur Ait-Oudhia Khatima, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, d'avoir accepté la codirection de ma thèse.

Je tiens à remercier infiniment Professeur Isabelle Villena, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (PU-PH) en Parasitologie-Mycologie, CHU de Reims, France., de m'avoir accueillie dans son laboratoire, ainsi que son équipe, docteur Dominique Aubert, et les techniciennes, Régine Geers et Emilie Josse, de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je tiens aussi à remercier infiniment, l'équipe de Limoge, Docteur Aurélien Mercier, Maître de Conférences des Universités en Parasitologie à la Faculté de Pharmacie de Limoges et Docteur Jean Benjamin-Murat, Maitre de conférences des Universités au CHU de Limoges, d'avoir participé à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont au Professeur Khelaf Djamel de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Ghalemi Farida,de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Chekiri Talbi Mey, du laboratoire central de biologie médicale, CHU de BLIDA, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Ouchene Nassime, de l'Institut Vétérinaire de Blida, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à monsieur Alloune, ainsi qu'a tout le personnel de bio-diag, laboratoire CERBA Hydra, Alger, d'avoir accepté l'expédition des prélèvements en France.

.

Je tiens également à remercier infiniment Docteur Saidi de la fourrière canine d'Alger, de m'avoir autorisée à réaliser les prélèvements au sein de son établissement.

Grand merci pour le département de biologie, faculté des sciences, Université de Médéa, d'avoir financé mon séjour en France durant la réalisation de la partie expérimentale.

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui je n'ai pas pu citer, et qui m'ont aidée directement ou indirectement pour réaliser ce travail.

Résumé

La toxoplasmose est une maladie parasitaire à répartition mondiale et c'est un problème majeur de santé publique. En Algérie, aucune donnée n'est actuellement disponible sur les génotypes de *Toxoplasma gondii* isolés à partir d'animaux ou d'humains. La présente étude évalue pour la première fois la séroprévalence de la toxoplasmose chez les chats errants et fournit une caractérisation moléculaire des souches de *T. gondii* circulantes dans cette population de félins à Alger, la capitale algérienne. Les sérums de 96 chats errants ont été testés pour déterminer la présence d'anticorps contre *T. gondii* en utilisant le test d'agglutination modifié. La séroprévalence était 50% (48/96) en utilisant 1: 6 comme seuil de positivité. Des échantillons d'organes différents provenant de chats errants, ont été testés pour déterminer la présence d'ADN de *Toxoplasma* en utilisant une PCR en temps réel. L'ADN de *T. gondii* a été détecté dans 90,6% (87/96) des cœurs. De ces ADN parasites, 22 ont été génotypés par l'analyse de 15 marqueurs microsatellites. Les génotypes identifiés (12 sur 22) appartenaient principalement à la lignée de type II.

Mots-clés: *Toxoplasma gondii*, chats errants, test d'agglutination modifié, PCR en temps réel, génotypage de microsatellites, Algérie

Abstract

Toxoplasmosis is a parasitic disease with worldwide distribution and a major public health problem. In Algeria, no data are currently available about genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from animals or humans. The present study assesses for the first time the seroprevalence of toxoplasmosis in stray cats, and provides molecular characterization of *T. gondii* strains circulating in this feline population in Algiers, the capital city of Algeria. Sera from 96 stray cats were tested for the presence of antibodies against *T. gondii* using the modified agglutination test. The seroprevalence was 50% (48/96) using 1:6 as the positivity cut-off. Different organs samples from stray cats were tested for the presence of *Toxoplasma* DNA using real-time PCR. *T. gondii* DNA was detected in 90.6% (87/96) of hearts. Of these parasitic DNAs, 22 were tentatively genotyped through the analysis of 15 microsatellite markers. The identified genotypes (12 of 22) mainly belonged to the type II lineage.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, stray cats, modified agglutination test, real-time PCR, microsatellite genotyping, Algeria

ملخص

داء التوكسوبلازما هو مرض طفيلي مع التوزيع في جميع أنحاء العالم، ويمثل مشكلة صحية عامة رئيسية .في الجزائر، لا توجد بيانات متاحة حاليا على المورثات من التوكسوبلازما معزولة عن الحيوانات أو البشر. تقيم هذه الدراسة للمرة الأولى في انتشار داء المقوسات في القطط الضالة ويوفر التوصيف الجزيئي لتعميم سلالات التوكسوبلازما في هذه الفئة من القطط في الجزائر، العاصمة الجزائرية .تم اختبار الأمصال من 96 القطط الضالة لوجود الأجسام المضادة ضد التوكسوبلازما باستخدام اختبار تراص .كان الانتشار المصلي 50٪ (96/48) باستخدام 1: 6 العتبة إيجابية.تم اختبار عينات من أجهزة مختلفة من القطط الضالة، بما في ذلك عينات القلب لوجود التوكسوبلازما DNA باستخدام PCR في الوقت الحقيقي .تم اكتشاف التوكسوبلازما DNA في 90.6٪ (96/87) من القلوب.22 DNA من هذه الطفيليات، خلال تحليل 15 من الواسمات الوراثية.المورثات التي تم تحديدها (12 من 22) تنتمي أساسا إلى سلالة النوع الثاني.

كلمات البحث: التوكسوبلازما، القطط الضالة، تعديل اختبار التراص، PCR في الوقت الحقيقي ، الصغرية التنميط الجيني، الجزائر

Liste des abréviations

ADHS : Agglutination direct haute sensibilité

ADN : Acide désoxyribonucléique

CI : Intervalle de confiance

Ct : Cycle threshold

Cq : Cycle de quantification

DL : Dose létale

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ER: Reticulum endoplasmic

HD : Hôte définitif

HI : Hôte intermédiaire

HURBAL : Hygiène Urbaine d'Alger

IFN-γ : Interferon gamma

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL-12 : Interleukine 12

MAT: Modified agglutination test

NK: Natural killer

PBS : Phosphate buffer solution

PCR : Polymérase chain réaction

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

RH : Résistant par hypersensibilité

SNP : Single nucleotide polymorphisme

TCR : T Cell Receptor

TNF : Tumor necrosis factor

Liste des tableaux **Page**

Tableau 1 : Marqueurs microsatellites et amorces PCR utilisés pour le test de PCR multiplex…….. 38

Tableau 2: Séroprévalence de *T. gondii*chez les chats errants…….. 39

Tableau 3: Séroprévalence de *T. gondii* selon le sexe et l'âge des chats errants…… 40

Tableau 4:Résultats d'analyse des cœurs de chats par la PCR en temps réel, selon le sexe…….. 40

Tableau 5: Comparaison de la PCR en temps réel par rapport aux résultats sérologiques du MAT……. 41

Tableau 6 : génotypage par les Microsatellites Multilocus des ADNs de *T. gondii* extraits des cœurs de chats errants (*Felis silvestris catus*) à Alger……. 44

Liste des figures **Page**

Figure 1 : Tachyzoïtes colorés au May- Grunwald Giemsa……. 5

Figure 2 : Ultrastructure parasitaire…….. 6

Figure 3 : Tachyzoïtes au May-Grunwald Giemsa formant des pseudokystes (culture cellulaire de *T.gondii* (tachyzoites, souche RH) sur fibroblaste MRC5) (× 400)…… 7

Figure 4 : kyste coloré au Giemsa…… 8

Figure 5 : Rupture de la paroi d'un kyste et libération de centaines de bradyzoïtes sous l'action des sucs digestifs…….. 8

Figure 6a: Oocystes non sporulés……. 9

Figure 6b : Oocystes sporulés…….. 10

Figure 7: Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*……... 13

Figure 8 : Fourrière canine d'Alger……. 27

Figure 9 : Résultats sérologiques d'agglutination des prélèvements sur plaque avec le test MAT……... 30

Figure10 : Extracteur automatisé d'ADN BioRobot EZ1 (Qiagen)…… 32

Figure 11: Thermocycleur (Bio-Rad iQ5)……... 34

Figure 12 : schéma des principales étapes de la qPCR avec utilisation d'une sonde TaqMan…….. 35

Figure 13 : résultats de qPCR d'organes de chats……... 42

SOMMAIRE

Introduction…….1

I. Etat actuel des connaissances sur la toxoplasmose

1. Historique……...….3

2. Définition…….....4

3. Etude de l'agent pathogène *Toxoplasma gondii* ……4

3.1. Taxonomie ……4

3.2. Morphologie des différentes formes …….....5

3.2.1. Le Tachyzoïte ou forme végétative……5

3.2.2. Le Bradyzoite…….7

3.2.3. Le Sporozoite……..9

3.3. Sensibilité des différentes formes de *Toxoplasma gondii* ……9

3.4. Cycle biologique de *Toxoplasma gondii*……...10

3.4.1. Evolution chez l'hôte définitif : le chat (cycle entéroépithélial)……. 11

3.4.2. Evolution chez l'hôte intermédiaire (cycle extra-intestinal)……...11

3.4.3. Particularités chez le chat……12

3.5. Génome et structure biochimique du parasite……...13

3.6. Aspect génétiques et phylogénétiques de *Toxoplasma gondii* ……14

3.7 .Corrélation génotype-pathogénicité …….15

3.7.1. Critères de pathogénicité ……15

3.7.2. Rôle de la souche infectante…… ……16

3.7.3. Caractéristiques des principaux génotypes de *Toxoplasma gondii* ……..16

4. Immunité anti-toxoplasme……...17

4.1. Réponse immunitaire naturelle ou non spécifique……18

4.2. Réponse immunitaire acquise spécifique……..18

5. Epidémiologie de la toxoplasmose……..19

6. Signes cliniques de la toxoplasmose féline…….....21

7. Diagnostic biologique…….....22

7.1. Diagnostic direct……...22

7.1.1. Diagnostic microscopique…….....22

7.1.2. Inoculation aux animaux…… 22

7.2. Diagnostic indirect (techniques sérologiques)……..23

7.2.1. Dye test (DT) appelé également test de lyse……...23

7.2.2. Test d'agglutination modifié (MAT) (voir partie expérimentale)……23

7.2.3. Test d'agglutination au latex (LAT)…….23

7.2.4. Test d'immunofluorescence indirect (IFAT)…….....23

7.2.5. Test immunoenzymatique (ELISA)…….24

7.3. Méthodes moléculaires basées sur la détection d'acides nucléiques parasitaires…… 24

7.3.1. PCR conventionnelle ……24

7.3.2. PCR en temps réel (voir partie expérimentale)……...24

7.4. Méthodes de génotypage basées sur les technologies moléculaires…….24

7.4.1. Analyse par microsatellite (voir partie expérimentale)……...25

7.4.2. Typage de séquences Multilocus (MLST)……..25

7.4.3. PCR-RFLP……. 25

II-Partie expérimentale

1. Matériels et méthodes…….....26

1.1. Éthique…….26

1.2. Lieu d'étude et échantillonnage……26

1.3. Examen sérologique……..28

1.4. Méthodes moléculaires…….30

1.4.1. Extraction d'ADN ……30

1.4.2. PCR quantitative en temps réel (qPCR)……32

1.4.3. Analyse génotypique ……36

1.5. Analyses statistiques ……...38

2. Résultats…….....39

2.1. Tests sérologiques ……...39

2.2. Détection et identification moléculaires ……..40

2.2.1. qPCR……41
2.2.2. Accord entre les tests sérologiques et la détection moléculaire…….....41
2.2.3. Génotypage……..43
3. Discussion….....46
Conclusion……..53

Introduction

Toxoplasma gondii est l'un des parasites protozoaires les plus fréquents qui infecte les mammifères et les oiseaux dans le monde. Un tiers de la population humaine dans le monde est considéré comme infecté chroniquement (Weiss and Kim, 2014). Il a été reconnu comme un important agent pathogène alimentaire et hydrique chez l'homme, entraînant parfois des flambées d'infections aiguës (Ajzenberg et al., 2010; Carme et al., 2009). Les félins jouent un rôle clé dans la transmission de *T. gondii* aux humains et aux autres animaux, par l'excrétion d'oocystes résistants à l'environnement dans leurs selles (Dubey, 2010).

Les humains sont infectés par *T.gondii* en mangeant de la viande infectée insuffisamment cuite ou par ingestion de nourriture ou d'eau contaminée par des oocystes émis par les félins (Dubey et al., 2009). Bien que les infections à *T.gondii* soient généralement asymptomatiques, la toxoplasmose peut être sévère chez l'homme dans certaines situations, surtout chez la femme enceinte, chez qui les infections peuvent conduire à une toxoplasmose congénitale. Cette dernière peut causer la cécité, le retard mental ou même la mort du fœtus (Montoya and Liesenfeld, 2004). Aussi, chez les patients immunodéprimés, l'infection ou la réactivation de *T.gondii* peut provoquer une encéphalite potentiellement mortelle ou une infection disséminée (Cook et al., 2000).

De plus, le toxoplasmose est une cause majeure d'avortement chez les ovins et les caprins (Tenter et al., 2000). Pour toutes ces raisons, la toxoplasmose est considérée comme un problème majeur de santé publique humaine et animale.

La séroprévalence globale de la toxoplasmose est en constante évolution, sous réserve des paramètres socioéconomiques régionaux et des habitudes de la population. (Pappas et al., 2009). Les données récentes sur la population humaine dans certains pays d'Afrique du Nord ont montré des taux de prévalence autour de 50% (Bouratbine et al., 2001; El Mansouri et al., 2007; El Deeb et al., 2012; Hammond-Aryee et al., 2014; Messerer et al., 2014; Gashout et al., 2016).La distribution des génotypes de *T.gondii* varie également d'un continent à l'autre (Ajzenberg et al., 2004; Lehmann et al., 2006; Dubey et al., 2007). En Europe et en Amérique du Nord, la structure de la population de *T.gondii* se compose principalement de trois lignées clonales distinctes appelées types I, II et III (Sibley and Boothroyd, 1992). Le type II est largement prédominant de l'extrême nord de l'Europe, (archipel arctique de Svalbard, Finlande) (Prestrud et al., 2008) jusqu'aux pays méditerranéens (Italy, Portugal, Greece).

Cette observation a été confirmée en France chez l'homme (Ajzenberg et al., 2002), ainsi que chez les animaux domestiques ou sauvages (Dumètre et al., 2006)(Aubert et al., 2010).

Cependant, peu de choses sont connues sur la distribution des génotypes de *T. gondii* en Afrique, et encore moins sur les génotypes circulant chez l'animal ou l'homme en Algérie.
Le but de la présente étude est de fournir des données épidémiologiques sur *T. gondii* en Algérie.
Dans cette étude, nous rapportons pour la première fois des données sur :
1. La séroprévalence de *T.gondii* chez les chats errants *Felis silvestris catus*
2. La caractérisation moléculaire de souches de *T. gondii* circulant dans cette population de chats au niveau d'Alger et ses environs.

Partie bibliographique

I. Etat actuel des connaissances sur la toxoplasmose

1. Historique

Toxoplasma gondii a été isolé pour la première fois en 1908, simultanément par Nicolle et Manceaux, à l'Institut Pasteur de Tunis, chez un rongeur nord- africain, le *gondii* (*Ctenodactylus gondii*) (Nicolle and Manceaux, 1909) et par Splendore au Brésil, chez un lapin (Splendor, 1909). Les noms de genre et d'espèce du parasite, proviennent de sa morphologie (toxon = arc et plasma = forme) et du rongeur chez lequel il a été découvert.

Par la suite, *Toxoplasma gondii* a été observé chez de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux, mais ce n'est que dans les années 1920à1930, que les premiers cas de toxoplasmose humaine ont été décrits : un cas de toxoplasmose congénitale avec manifestations oculaires en 1923 ,un cas d'encéphalite chez un enfant en 1939(Wolf et al., 1939).

Les données sur la toxoplasmose et son épidémiologie, ont été acquises très progressivement. La mise au point des premiers tests sérologiques (Dye Test par Sabin et Feldmann) dans les années 1940 a révélé la forte prévalence de la toxoplasmose humaine.

Le cycle biologique complet de ce parasite et la compréhension de son mode de transmission n'ont été établis que dans les années 1967 et 1973par Hutchison, d'une part (Hutchison, 1967a) et par Frenkel et Dubey, d'autre part (Frenkel, 1973).En effet le rôle dans la transmission de la consommation de viande insuffisamment cuite et notamment de viande de mouton, n'a été clairement identifié que dans l'année1965 (Desmonts et al., 1965).Ce n'est enfin qu'en 1969 que le rôle du chat comme hôte définitif et l'existence des oocystes ont été démontrés, ce qui a permis alors de comprendre les circonstances de contamination des herbivores et de décrire le cycle de ce parasite(Hutchison, 1967a)(Frenkel, 1973).

A ce jour, hormis les félidés, aucune autre famille animale n'a été identifiée comme hôte définitif possible**.**

Depuis, d'énormes progrès dans le diagnostic immunologique et parasitologique ont permis de préciser l'épidémiologie et l'évolution clinique selon le terrain. Les deux dernières décennies, ont été marquées par le souci de maitriser la transmission matérno-fœtale. La fréquence des immunodépressions a par ailleurs imposé l'amélioration du diagnostic précoce, du traitement curatif et des préventions primaires et secondaires de la réactivation toxoplasmique**.**

2. Définition

La toxoplasmose est une maladie parasitaire commune à l'homme et à plusieurs espèces animales, responsable d'une anthropozoonose largement répartie dans le monde.
Elle est due à un protozoaire intracellulaire obligatoire : *Toxoplasma gondii.*
Les félidés domestiques ou sauvages représentent les hôtes définitifs de ce parasite.
Ils émettent dans leurs matières fécales, un grand nombre d'oocystes qui, après sporulation, maintiennent leur infectiosité pendant plusieurs mois dans l'eau et le sol.
L'ensemble des homéothermes, mammifères terrestres ou marins (Homme, bovins, ovins, caprins, suidés, rongeurs……etc.)et oiseaux, peuvent héberger le toxoplasme en tant qu'hôtes intermédiaires. Chez l'homme, la toxoplasmose est une maladie généralement bénigne voire inapparente mais peut être grave chez les individus immuno-déficients et les femmes enceintes (avortements spontanés ou transmission chez le fœtus réalisant la toxoplasmose congénitale avec des atteintes cérébrales et oculaires) (Kieffer and Wallon, 2013).
La toxoplasmose est également une maladie d'intérêt vétérinaire, elle représente une cause importante d'avortements, momification, malformations fœtales et de mortinatalité chez les animaux d'élevage (bovins, ovins, caprins) avec des pertes financières qui en découlent et qui peuvent être potentiellement lourdes (Tenter et al., 2000)(Aurélien, 2005)(Opsteegh et al., 2010)

3. Etude de l'agent pathogène : *Toxoplasma gondii*

3.1. Taxonomie

Toxoplasma gondii est un protozoaire des animaux à sang chaud, à développement endocellulaire obligatoire. Le toxoplasme a ainsi été décrit comme étant capable d'infecter plus de 350 espèces différentes de mammifères et d'oiseaux (Lindsay et al., 1997)(Tenter et al., 2000)**.**

Rattaché au groupe des Apicomplexa (présence d'un complexe apical, caractéristique permettant l'entrée dans les cellules hôtes).Il appartient au Phylum : Apicomplexa ; Classe: Sporozoasida ; Subclasse: Coccidiasina ; Ordre: Eimeriorina ; Famille: Toxoplasmatidae ; Genre: *Toxoplasma* ; Espèce: *gondii* (Dubey, 2010).

3.2. Morphologie des différentes formes

Le toxoplasme présente au cours de son cycle 3 stades potentiellement infectieux pour les organismes homéothermes: le tachyzoïte, le bradyzoite et le sporozoite.

Ces stades infectieux sont reliés dans un cycle de vie complexe (Sibley and Ajioka, 2008a)

3.2.1 Le tachyzoïte ou forme végétative

- Au microscope optique le tachyzoïte a la forme d'un croissant asymétrique et mesure 6µm - 7µm de long sur 2µm - 3µm de large, avec une extrémité antérieure effilée et une extrémité postérieure arrondie, dans laquelle est logé un gros noyau **(Figure 1).**

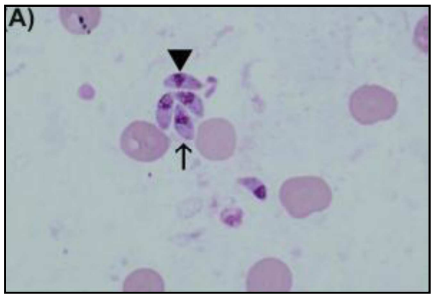


Figure 1 : Tachyzoïtes colorés au May- Grunwald Giemsa (Weiss and Kim, 2014)

- Au microscope électronique, il montre divers organites spécifiques :

- La paroi du parasite apparait formée de trois membranes, le plasmalemme à l'extérieur et deux membranes formant le complexe membranaire interne, composé d'un ensemble de vésicules aplaties.
- Le complexe apical est une structure caractéristique des Apicomplexa. Il est situé dans la partie antérieure du tachyzoïte et comprend le conoïde, les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. Le conoïde, en forme de cône, est constitué de filaments de tubuline polymérisée enroulés en spirale, les rhoptries au nombre d'une dizaine, sont en forme de massue de1 à 4 µm de long, les granules denses sont des structures sphériques de 200 nm de diamètre, qui apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique et les micronèmes sont des petits, organites apicaux en forme de bâtonnets

Le complexe apical permet la pénétration du parasite à l'intérieur de la cellule hôte faisant intervenir la sécrétion coordonnée des différents organites de sécrétion (micronèmes, rhoptries et granules denses). Les rhoptries interviennent dans la sécrétion d'enzymes protéolytiques, favorisant cette pénétration. Autre organelle typique des Apicomplexa, l'apicoplaste, plastide dérivant d'un chloroplaste ancestral, a un rôle encore mal défini

(Figure 2). Le tachyzoïtes contient également les organites classiques de toute cellule eucaryote, un noyau, un réticulum endoplasmique (ER), un appareil de Golgi réticulé, des ribosomes, des lysosomes et une mitochondrie unique (Gendrin, 2007).

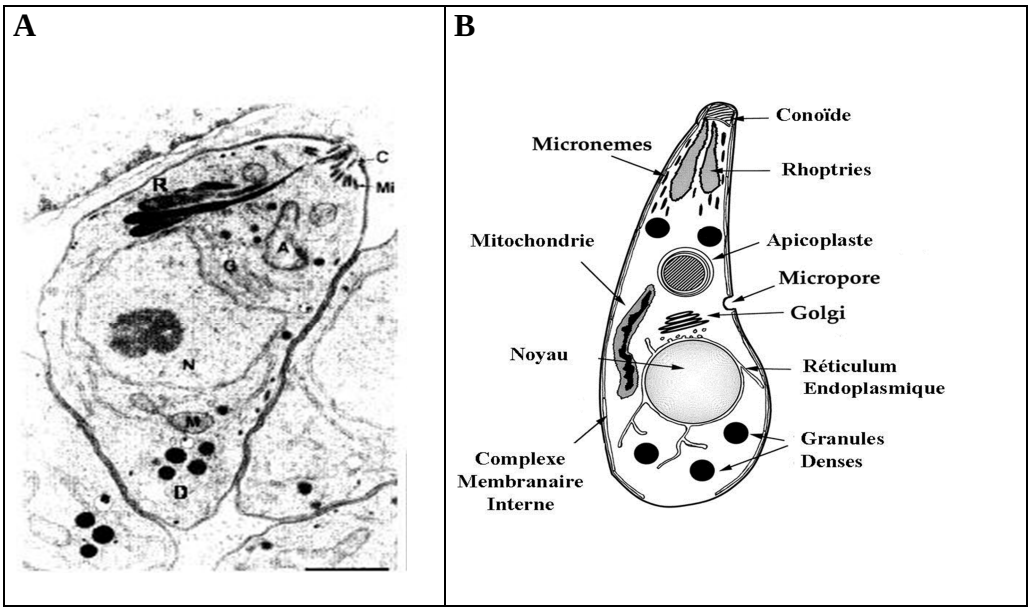


Figure 2 : Ultrastructure parasitaire.
A-Tachyzoïte intracellulaire en microscopie électronique, d'après Dubremetz, 1998. A, apicoplaste ; C, conoïde ; D, granules denses ; G, appareil de Golgi ; Mi, micronèmes ; M, mitochondrie ; N, noyau ; R, rhoptries. Barre 1µm.
B- Schéma structural du parasite, d'après (Black and Boothroyd, 2000).

Chez l'hôte, les tachyzoïtes se reproduisent très rapidement toutes les 4 à 6 heures, par un processus de multiplication asexuée par bourgeonnement interne de deux cellules filles, ce processus est appelé endodyogénie. Ce dernier se déroule à l'intérieur des cellules hôtes entrainant la formation de pseudokystes. On peut compter jusqu'à cent tachyzoïtes, voire deux cents parfois par pseudokyste. Ces derniers sont situés dans une vacuole parasitophore (phagosome) distendue par la multiplication intense du parasite et entourée de nombreuses mitochondries qui interviennent dans le processus de multiplication du parasite, **(Figure 3).**

Les pseudokystes sont colorables par le MGG (May-Grunwald-Giemsa) et le PAS (acide périodique de schiff), et leur paroi externe, simple est très mince (il s'agit de la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte) (Boisson, 2002).

Leur durée de vie est courte puisque la vacuole parasitophore puis la cellule-hôte finissent par éclater, libérant alors les tachyzoites. Sous la pression de la réponse immunitaire mise en

œuvre par un hôte immunocompétent, ces pseudokystes se transforment en kystes (Alexander et al., 2005).

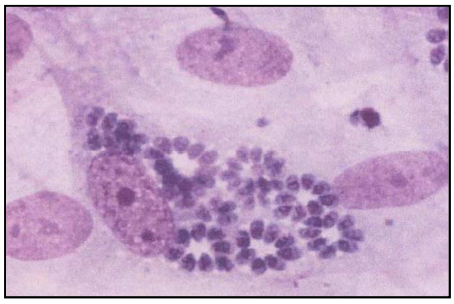


Figure 3 : Tachyzoïtes au May-Grunwald Giemsa formant des pseudokystes (culture cellulaire de *T.gondii* (tachyzoites, souche RH) sur fibroblaste MRC5) (× 400) (Afssa, 2005).

3.2.2. Le bradyzoite

Chez l'hôte intermédiaire, les bradyzoïtes sont contenus, dans des kystes intra-tissulaires.

Ces derniers correspondent à des cellules hôtes extrêmement dilatées (30 à 150 µm de diamètre), dont les structures ont pratiquement disparu. Les restes du noyau sont refoulés à la périphérie et la cellule peut contenir des milliers de bradyzoïtes. Comparable en de nombreux points au tachyzoïtes, le bradyzoite est cependant légèrement plus petit (4 à 6 µm de long pour 2 à 3 µm de large) et sa multiplication est lente, (forme quiescente du parasite).

Cette transformation en kyste s'accompagne de la modification de la vacuole parasitophore dont la membrane et la matrice entre les parasites s'épaississent par dépôt d'un matériel granulaire dense aux électrons **(Figure 4-5).** Ainsi se constitue le kyste toxoplasmique (Tomavo, 2001).Ces particularités structurales et métaboliques rendent le kyste toxoplasmique et les bradyzoïtes inaccessibles en pratique aux traitements antitoxoplasmiques actuels (Dubey, 1998).

Le passage de la forme pseudokystique à la forme kystique est un phénomène qui intervient très rapidement (dès 48 heures en culture cellulaire ; dès le 6ème jour après l'infection dans la toxoplasmose expérimentale de la souris) (Tomavo, 2001).

Ce passage de la forme pseudokystique à la forme kystique est la conséquence de l'acquisition par l'hôte d'un état d'immunité, mais aussi de facteurs génétiques hôte-dépendants. L'élément déclenchant majeur de cette transformation est une inhibition de l'activité mitochondriale des parasites sous l'influence de protéines de stress du toxoplasme

induites par différents stimuli tels que IFN-γ, NO (oxyde nitreux), TNF ou l'élévation du pH. (Tomavo, 2001).

Les kystes peuvent se former dans n'importe quel type cellulaire mais persisteront préférentiellement dans les neurones (notamment dans les astrocytes), les cellules musculaires (muscles lisses, striés squelettiques et myocarde) et les cellules rétiniennes.

La durée de vie des kystes tissulaires peut être très longue. Si certains dégénèrent d'autres peuvent persister jusqu'à la mort de l'hôte. Lorsque les pseudokystes se transforment en kyste, la toxoplasmose jusque –là « active » ou « évolutive », devient « latente » et « chronique ». Cette dernière peut devenir à nouveau évolutive (réactivation) si la réponse immune de l'hôte devient insuffisante : les kystes reprennent alors une multiplication tachyzoitique (Euzéby, 1997).

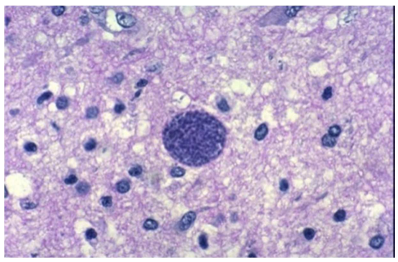


Figure 4 :kyste coloré au Giemsa (source (ANOFEL, n.d.))

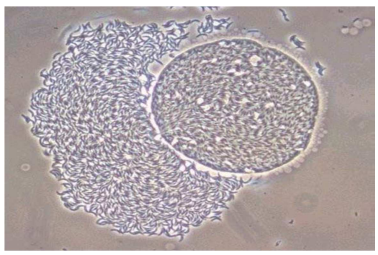


Figure 5 : Rupture de la paroi d'un kyste et libération de centaines de bradyzoïtes sous l'action des sucs digestifs (Dubey, 2010).

3.2.3. Le sporozoïte

Le stade sporozoite présent dans les oocystes sporulés est l'élément infectant résultant de la reproduction sexuée ou gamogonie (gamétogonie) qui se déroule dans les cellules intestinales du chat et d'autres félidés. Les oocystes (ookystes) sporulés sont une forme de résistance dans le milieu extérieur.

Après fécondation et élimination dans les fèces du chat, des oocystes immatures (non sporulés), sont de formes arrondies, mesurant 10 à 12 µm de diamètre, avec une double paroi. Ils contiennent une masse unique, le sporoblaste (sporonte) et sont diploïdes **(Figure 6a)**.

Ils doivent subir une sporulation dans le milieu extérieur pour devenir matures (donc infectieux), sporulation qui dure de 1 a 5 jours en fonction de la température, du degré d'oxygénation et de l'humidité **(Figure 6b).**

Après sporogonie, à l'intérieur de l'oocyste sporulé s'individualisent deux sporocystes (6-8 µm × 9-12µm) renfermant chacun quatre sporozoïtes haploides (2 × 6-8µm) (Euzéby, 1997). La structure de ce dernier est proche de celle du tachyzoite mais s'en distingue par des micronémes et des rhoptries plus abondants (Dubey et al., 1998).

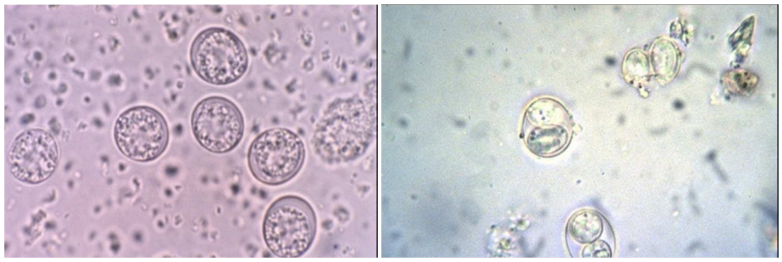


Figure 6a: Oocystes non sporulés **Figure 6b** : Oocystes sporulés (ANOFEL, n.d.)

3.3. Sensibilité des différentes formes de *Toxoplasma gondii*

Les oocystes sporulés peuvent survivre et rester infectieux dans l'eau, à température

ambiante pendant 15 mois (Hutchison, 1967b), ils peuvent survivre plusieurs jours à 35 °C mais sont tués à une température de 60 °C pendant 1 minute. Ils sont très résistants aux produits désinfectants tels que l'eau de javel (Dubey et al., 1998).Les oocystes sont viables après une congélation à - 21 °C pendant 28 jours (Jones and Dubey, 2012). À la température + 4 °C, les oocystes restent viables pendant au moins 54 mois et restent infectieux pendant 18 mois. Ils peuvent sporuler dans une eau à 1,5 et 3,2 % de salinité, à température ambiante.

Les tachyzoïtes sont très fragiles, leur ingestion n'est pas contaminante car ceux-ci sont sensibles aux sucs gastriques (Euzéby, 1997).Ils peuvent par contre survivre et persister plusieurs jours dans les liquides physiologiques comme le lait à 4°C et sont dans ces conditions parfois source d'infection (Yamamoto et al., 2000), mais ils sont détruits par la pasteurisation (Tenter et al., 2000).

Les kystes sont tués à une température de 67 °C et par une congélation à - 20 °C, ils restent infectants après plusieurs semaines à 4 °C. La cuisson de la viande contenant des kystes au four à micro-ondes ne permet pas d'éliminer totalement le parasite, probablement en raison de l'hétérogénéité de la température atteinte au sein de la pièce de viande (Lundén and Uggla, 1992).

Les trois formes parasitaires sontsensibles à la chaleur, et donc à la cuisson. Cette information est primordiale dans les mesures de prévention à appliquer contre l'infection toxoplasmique. Parmi les autres conditions pouvant être utilisées dans le traitement des aliments, seule l'ionisation à une dose minimale de 0,5 kGy a été recommandée. Les autres modes de traitement (micro-onde, salaison, fumaison) n'ont pas une efficacité certaine (Afssa, 2005). Les tachyzoïtes sont les formes les plus sensibles à la dessiccation, mais les oocystes le sont également. Une suspension d'oocystes de toxoplasmes laissée à sécher complètement pendant 24 heures perd son pouvoir infectieux (Garcia-Méric et al., 2010).

3.4. Cycle biolologique de *Toxoplasma gondii*

Le cycle évolutif du toxoplasme est complexe. Ce cycle peut être dixène ou monoxène.

Il est facultativement dixène (HI-HD), dans ce cas le chat (HD) s'infecte par ingestion de kystes formés chez un HI. Le cycle peut se faire aussi uniquement chez le chat, cycle monoxène (HD-HD). Dans ce cas, il se contamine par ingestion de terre (géophagie), d'eau (hydropinie), de végétaux souillés (phytophagie) ou par des ookystes sporulés. Le cycle peut se maintenir même entre hôtes intermédiaires (HI-HI) avec possibilité de transmission du parasite par carnivorisme et selon un processus de multiplication asexuée. Ce cycle entre hôtes intermédiaires se déroule sans intervention du chat.

Les hôtes intermédiaires possibles sont extrêmement variés (animaux homéothermes : mammifères dont l'Homme, chat, oiseaux, et sont parfois très nombreux à intervenir dans un cycle. Le toxoplasme est un des parasites les plus polyxènes connu à ce jour. La transmission de ce parasite à l'Homme, et plus généralement à l'ensemble des hôtes intermédiaires, se fait par consommation de viande infectée, mais aussi par l'ingestion d'oocystes présents dans les fèces de félidés sauvages ou domestiques pouvant souiller le sol, les eaux de ruissellement et tout aliment en contact. C'est sous cette dernière forme que le toxoplasme circule dans l'environnement extérieur (Petersen and Dubey, 2001).

Le cycle biologique de *Toxoplasma gondii* comprend deux étapes **(Figure 7)**

-une phase de reproduction dans l'intestin du chat qui est l'hôte définitif.

-une phase proliférative chez les hôtes intermédiaires.

3.4.1. Evolution chez l'hôte définitif : le chat (cycle entéro-épithélial) ou « cycle intestinal de type coccidien chez le chat »ou « coccidiose toxoplasmique »

Le cycle entéro-épithélial n'a lieu que chez l'hôte définitif (félidés), où une reproduction sexuée se déroule dans ces entérocytes. Le chat s'infeste en dévorant des rongeurs ou des oiseaux parasités par des kystes ou à partir d'oocystes mûrs souillant la terre ou les herbes.

Après ingestion du kyste ; la paroi du kyste est progressivement détruite par l'action simultanée des contractions stomacales, du péristaltisme intestinal et des sucs digestifs. Certains bradyzoites pénètrent alors dans les entérocytes de l'intestin grêle. En position intracellulaire, le bradyzoite devient schizonte : c'est un stade intermédiaire, précédant la multiplication, et qui connait une phase de croissance. Les schizontes subissent alors la multiplication asexuée par schizogonies successives ; il en résulte de nombreuses générations constituant cinq types morphologiques différentes : les types A, B, C, D, et E. Parmi eux, seuls les schizontes de type E, et probablement de type D aussi, se différencient en gamontes puis en gamètes mâles et femelles : c'est la phase de reproduction sexuée ou gamétogonie.
Lorsque les cellules hôtes des microgamétocytes éclatent, les microgamètes (gamètes mâles) pénètrent dans la cellule-hôte puis dans les macrogamontes (gamètes femelle). Il y a alors fécondation et fusion des deux noyaux haploïdes qui aboutit à la formation d'un zygote diploïde.
Après la fécondation, les zygotes s'enkystent et deviennent des oocystes immatures ; ces derniers sont libérés dans le milieu extérieur avec les selles de l'hôte.
Lorsque les conditions d'humidité, de température et d'oxygénation du milieu sont favorables, la sporulation peut se produire ; les ookystes sont alors matures L'ingestion de ces ookystes par un nouvel hôte (intermédiaire ou définitif) permettra ensuite la poursuite du cycle.

3.4.2. Evolution chez l'hôte intermédiaire (cycle extra-intestinal)

Le cycle extra-intestinal a lieu aussi bien chez les hôtes définitifs que chez les hôtes intermédiaires et résulte le plus souvent de l'ingestion d'ookystes sporulés ou de kystes.
Les sporozoïtes ou bradyzoïtes libérés par l'action mécanique enzymatique de la partie antérieure du tube digestif, se transforment en tachyzoïtes. Ces derniers traversent la paroi digestive pour se répandre dans les tissus extra-intestinaux via la circulation lymphatique et la circulation sanguine. Ces tachyzoites arrivent ainsi à l'intérieur des cellules cibles (cellules du

système des phagocytes mononuclées : monocytes, histiocytes, macrophages mais aussi dans les cellules épithéliales, les fibroblastes, les hépatocytes et les neurones.).

La multiplication endocellulaire aboutit à la constitution de pseudokystes (cellules hôtes bourrées de tachyzoïtes). Ces pseudokystes peuvent produire jusqu'à 250 tachyzoïtes, immédiatement capables d'infester de nouvelles cellules hôtes. La rupture des pseudokystes assure ainsi la dissémination intra-organique du toxoplasme c'est la phase aiguë de la maladie (au cours de la toxoplasmose évolutive). L'orsqu'une réponse immune efficace est mise en place, la multiplication tachyzoitique est ralentie et les pseudokystes à tachyzoites se transforment (de façon réversible) en kyste à bradyzoites.Ces derniers, s'ils sont consommés par un nouvel hôte, pourront initier un nouveau cycle (entérique et/ou extra-intestinal, selon l'hôte) (Dion, 2010).

3.4.3. Particularités chez le chat

Chez l'hôte définitif, il existe deux particularités, une partie des bradyzoites ingérés réalisent le cycle entérique et lors de l'ingestion d'ookystes sporulés le cycle extra-intestinal est initié le premier. En effet, seuls les bradyzoites sont capables d'initier le cycle coccidien (Dion, 2010). Les sporozoites n'envahissent donc pas directement les entérocytes, mais ils traversent la muqueuse intestinale pour aller se loger dans la lamina propria intestinale ; là, ils se multiplient par tachy-endodyogénie et colonisent (via le sang et la lymphe) sous la forme tachyzoitique les différents tissus extra-intestinaux : c'est le cycle extra-intestinal. Les kystes à bradyzoites se forment une dizaine de jours après la contamination. L'ouverture de certains d'entre eux libère des bradyzoites qui vont gagner (via la lymphe et le sang) la lamina propria intestinale puis l'épithélium intestinal. Localisés dans les lymphocytes intraépithéliaux et enfin ils infectent les entérocytes pour y réaliser le cycle entéro-épithélial (Mercier et al., 2010).

Chez le chat, la période prépatente est de 4 à 10 jours lors d'ingestion d'un petit nombre de kystes, 3 à 6 jours lors d'infection massive alors qu'elle peut durer 15 à 40 jours (généralement au moins trois semaines) lors d'infection par des ookystes.

La période patente est de1 à 3 semaines avec un pic d'excrétion situé entre le quatrième et le huitième jour, lors d'ingestion de kystes. L'infection par des ookystes entrainent une période prépatente irrégulière, de quelques jours à trois semaines (le plus souvent quelques jours), et l'excrétion d'un faible nombre d'ookystes. Lors de toxoplasmose congénitale, quel que soit l'hôte, les tachyzoites colonisent par voie sanguine, d'abord le placenta, puis l'ensemble des

organes du fœtus et réalisent le cycle extra-intestinal (puis le cycle entéro-épithélial, chez l'hôte définitif uniquement (Sato et al., 1993)(Mercier, 2010)(Dion, 2010).

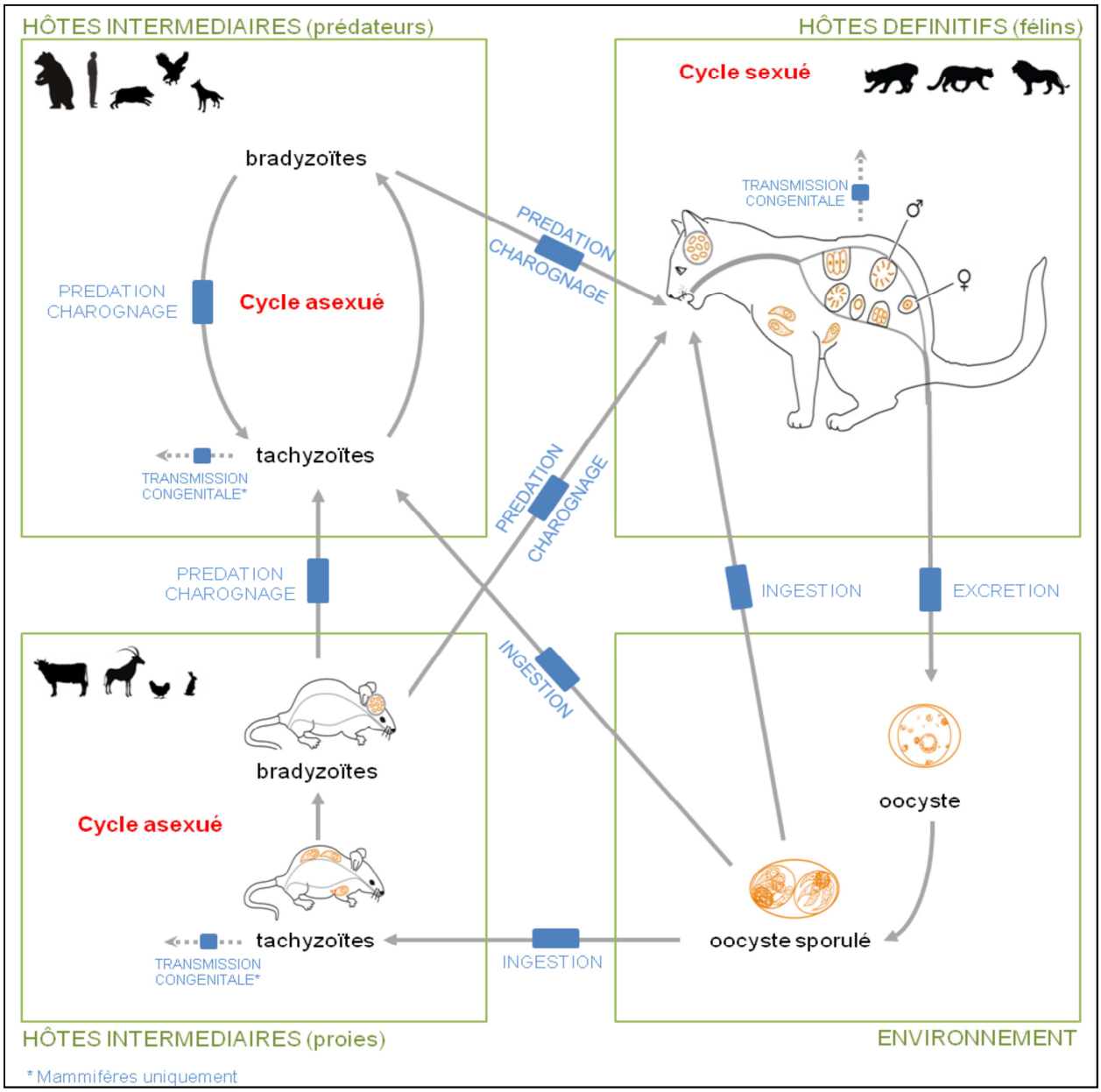


Figure 7: Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* (Sibley and Ajioka, 2008b)

3.5. Génome et structure biochimique du parasite

Le noyau de *Toxoplasma gondii* est haploïde, à tous les stades, sauf au cours de la division sexuelle dans l'intestin du chat (Wyler, 1990). Ajioka et Sibley, 2014 indiquent que le macrogamète femelle fertilisé contient deux fois la quantité d'ADN trouvée dans tous les autres stades. Les sporozoïtes sont les résultats de la méiose et semblent suivre les lois mendéliennes classiques. le génome haploïde totale de *T.gondii* contient 14 chromosomes et

7793 gènes, avec une taille du génome total de 63, 495, 144 paires de bases (Ajioka and Soldati, 2007)(Sibley, 2009).

C'est un parasite inhabituel en raison de sa large gamme d'hôtes et avec une seule espèce dans le genre, il a également deux génomes extra-chromosomiques circulaires, celui de la mitochondrie et celui de l'apicoplaste (Fichera and Roos, 1997)(Wilson and Williamson, 1997). La quantité de guanine et de cytosine est de 50% avec un faible taux de methylation de l'ADN.

La structure biochimique de *Toxoplasma gondii* est complexe. C'est le stade tachyzoïte qui est le mieux connu et plusieurs molécules ont été identifiées à sa surface. La protéine P 30, la plus abondante (constituant 5% des protéines totales), joue un rôle important dans la réponse immunitaire (Protéine immunogène entrainant une réponse d'anticorps rapide). Certaines protéines sont spécifiques du stade sporozoïte (P25 et P67), du stade bradyzoite (P18, P21, P34 et P 36) et du stade tachyzoïte (P22, P30 et P35)(Priet, 2003).

3.6. Aspects génétiques et phylogénétiques de *Toxoplasma gondii*

Depuis une quinzaine d'années, des études ont été entreprises pour analyser la diversité génétique de l'espèce *Toxoplasma gondii*. Les méthodes de typage ont d'abord fait appel à des techniques isoenzymatiques (Dardé et al., 1992), puis aux techniques de biologie moléculaire : PCR-RFLP(Sibley and Boothroyd, 1992)(D. Howe and Sibley, 1995), analysent des microsatellites (Ajzenberg et al., 2004)(Lehmann et al., 2004).

Plus d'une cinquantaine de marqueurs sont actuellement décrits, les plus utilisés font appel au polymorphisme de gènes codant pour des antigènes majeurs du toxoplasme.

Le typage doit reposer sur l'analyse de plusieurs loci polymorphes. Les études concordent pour regrouper la majorité des isolats analysés en 3 génotypes multilocus principaux : types I, II et III, équivalents à des lignées clonales, stables dans le temps et l'espace (Dardé et al., 1992)(K. D. Howe and Sibley, 1995).Cette structure clonale n'exclut pas la possibilité de transferts génétiques occasionnels entre les 3 principales lignées comme en témoigne l'existence d'isolats présentant une combinaison différente des allèles classiques (Grigg et al., 2001).

D'autres isolats atypiques se caractérisent par la présence d'allèles uniques, non retrouvés parmi les allèles des 3 génotypes majeurs(Carme et al., 2002)(Ajzenberg et al., 2004).

Ces divers isolats atypiques sont plus volontiers retrouvés dans des biotopes éloignés de l'influence humaine et de celle des chats domestiques. La possibilité d'un réservoir sauvage

de la biodiversité du toxoplasme apparaît au fur et à mesure des isolements d'animaux sauvages (Carme et al., 2002)(Ajzenberg et al., 2004)**.**

Les génotypes « classiques » I, II et III seraient, au moins en Europe et aux Etats-Unis, des lignées particulièrement bien adaptées à l'homme et aux animaux domestiques, sources habituelles de la contamination humaine et animale (chat, mouton, porc, volaille, etc.).

Leur expansion aurait été favorisée par le développement de l'élevage (Lehmann et al., 2003)

En tenant compte de la limite liée à un échantillonnage des isolats encore peu diversifié sur le plan zoologique et géographique, il ne semble pas y avoir de spécificité d'hôte des différents génotypes. Les 3 génotypes principaux, ainsi que des génotypes atypiques peuvent être retrouvés chez l'homme comme chez l'animal (Ajzenberg et al., 2004)**.**

3.7. Corrélation génotype-pathogénicité

Quatre facteurs parasitaires peuvent être évoqués pour expliquer des différences de pathogénicité : la souche infectante, le stade, le nombre de parasites transmis, la voie de contamination. Il est difficile parfois de faire la part de chacun de ces facteurs, d'autant que la virulence observée est également dépendante de l'hôte (Afssa, 2005).

3.7.1. Critères de pathogénicité

Ils sont assez bien définis chez l'animal, notamment par les études expérimentales effectuées chez la souris (Dubey, 1996)(Dubey et al., 1997).

Ces critères se résument comme suit:

- la mortalité est estimée par la proportion d'animaux morts en fonction du nombre d'animaux infectés par des parasites et provoquent la mort des souris inoculées (dose létale 50 ou 100, doses minimales de parasites entraînant la mort de 50% ou de 100% des souris infectées).
- l'existence ou non de signes cliniques, leur nature (altération de l'état général, ascite, signes neurologiques), leur sévérité.
- le nombre de kystes présents dans le cerveau lors des infections chroniques.

Ces critères peuvent être complétés par des données anatomo-pathologiques, à la recherche de signes d'encéphalite et d'atteintes inflammatoires dans différents organes (intestin, ganglions, poumons) (Dubey and Frenkel, 1973)(Dubey, 1996), par l'évaluation des charges parasitaires(Flori et al., 2002), ou par l'analyse de la réponse inflammatoire (Mordue et al., 2001)(Robben et al., 2004).

Ces différents éléments permettent de classer la toxoplasmose chez l'animal en toxoplasmose asymptomatique ou chronique avec absence de manifestations cliniques et de mortalité après inoculation des toxoplasmes, en toxoplasmose aiguë lors de mortalité importante et précoce (7 à 10 jours) après inoculation des toxoplasmes et en toxoplasmose subaiguë quand les manifestations cliniques, essentiellement d'ordre neurologique, surviennent dans les semaines ou les mois après inoculation, pouvant entraîner une mortalité prématurée.

3.7.2. Rôle de la souche infectante (données expérimentales chez la souris et *in vitro*)

Le génotype de la souche infectante est l'élément majeur influençant la pathogénicité chez la souris. Le phénotype « virulence pour la souris » pourrait être associé en partie à des gènes situés sur le chromosome VII du toxoplasme (Su et al., 2002).

Les différences entre les principaux génotypes d'isolats concernent :

- la virulence pour la souris : une souche est considérée comme virulente pour la souris

lorsque la dose létale (DL) 100 est d'un tachyzoïte inoculé par voie intrapéritonéale, entraînant constamment la mort de 100% des souris infectées en moins de 10 jours. Alors qu'une souche est considérée comme non virulente pour la souris lorsque la (DL) 100 est supérieure à 10^3tachyzoïtes inoculés par voie intrapéritonéale. Enfin et aussi une souche peut être qualifiée de virulence intermédiaire pour la souris lorsqu'elle est responsable d'une toxoplasmose subaiguë (critères de (DL) 100 ou (DL) 50 non définie).

- la vitesse de multiplication en culture cellulaire et la possibilité de transformation *in vitro* des tachyzoïtes en bradyzoïtes aboutissent à la formation de kystes (Soete et al., 1993).
- Les capacités de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques sont constatées (Barragan and Sibley, 2002).

3.7.3. Caractéristiques des principaux génotypes de *Toxoplasma gondii* (Afssa, 2005).

Génotype I

Il est très rarement isolé (ne représente que 10% des souches en Europe et aux Etats-Unis, principalement isolé chez l'homme). C'est un génotype très virulent pour la souris, par exemple, la souche RH a une DL100 de 1 tachyzoïte chez la souris.

Les tachyzoïtes se multiplient rapidement in vitro, se transforment peu en bradyzoïtes et en conséquence, peu de kystes sont formés (ces souches peu kystogènes sont peu infectantes pour le chat). Leur capacité de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques *ex vivo* est supérieure à celle des types II et III.

Chez la souris, les souches de génotype I entraînent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ) en excès.

Lors de toxoplasmose humaine causée par ces souches, les atteintes congénitales sont souvent sévères. Il est possible de les isoler à partir de toxoplasmoses de réactivation au cours des états d'immunodéficience.

Génotype II (exemples : souches ME49 et 76K)

C'est le génotype le plus fréquent chez l'homme (80% des souches humaines en Europe et aux Etats-Unis), le mouton, le porc...etc. Il est non virulent pour la souris ((DL) $100 \geq 10^3$ tachyzoïtes), mais ces souches sont kystogènes donc infectantes pour le chat et génératrices d'ookystes.

Chez la souris, la sécrétion d'IFN- γ est contrôlée et protectrice, il y a par ailleurs induction précoce de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages.

Lors de toxoplasmose humaine, les atteintes congénitales peuvent être asymptomatiques à mortelles. Des réactivations sont possibles au cours des états immunodéficients (ce sont les souches prédominantes chez les sidéens). Chez le patient immunocompétent, on observe des formes lymphadénopathiques et des formes asymptomatiques.

G**énotype III** (exemple : souche VEG)

Il est plus rare (génotype surtout confiné à l'animal) sa virulence pour la souris est intermédiaire. Concernant la toxoplasmose humaine, les atteintes congénitales sont possibles mais peu fréquentes.

Génotypes recombinants ou avec allèles atypiques

Ils sont plus souvent isolés dans des circonstances épidémiologiques particulières (animaux, biotopes sauvages) et sont plus virulents chez la souris que le type II.

Lors d'infection chez l'homme, on peut observer des atteintes sévères disséminées ou oculaires chez des sujets immunocompétents.

4. Immunité anti-toxoplasme

La réponse immunitaire à l'infection par *Toxoplasma gondii* est individuelle, complexe et compartimentée. Cette variation individuelle peut être expliquée par le niveau élevé d'hétérogénéité dans les antécédents génétiques. De plus, *Toxoplasma gondii* a la capacité de se propager dans tous les tissus et chaque compartiment tissulaire, a sa propre réponse immunitaire spécifique, en particulier dans le système nerveux central et dans le placenta.

Un degré de complexité supplémentaire est obtenu en raison de la possibilité d'une infection récurrente avec des souches de *Toxoplasma* à virulence variable (Filisetti and Candolfi, 2004).

4.1. Réponse immunitaire naturelle ou non spécifique

T. gondii est capable de déclencher l'activation non spécifique des macrophages et des cellules NK avec d'autres cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Cette activation est destinée à limiter la prolifération parasitaire due à son action cytotoxique directe ou indirecte et à déclencher une réponse immunitaire spécifique due à la présentation d'antigènes *Toxoplasma*. Cette réponse non spécifique commence immédiatement après le premier contact entre le parasite et l'hôte. Il atteint un pic à la fin de la première semaine, puis diminue lentement jusqu'à ce qu'il disparaisse finalement deux semaines après le début de l'infection (Hauser et al., 1983).

4.2. Réponse immunitaire acquise spécifique

La réponse immunitaire non spécifique a conduit à la différenciation des macrophages et des lymphocytes B en cellules présentatrices d’antigène. Les cellules effectrices sont stimulées par des cellules dendritiques présentant l'antigène aux lymphocytes T TCR. Cependant, ce mécanisme nécessite une interaction étroite entre la cellule présentatrice d’antigène et le lymphocyte T grâce au système CD40-CD40L. L'infection des cellules dendritiques par le *Toxoplasme* vivant conduit à l'activation du CD40 (Subauste and Wessendarp, 2000).

Concernant la réponse humorale, les IgM sont les premiers anticorps à apparaître. Ils sont détectés dans le liquide péritonéal des souris, à la surface du *Toxoplasma*, à partir du deuxième jour suivant l'infection. Ces immunoglobulines sont les meilleurs activateurs du système du complément. En outre, en raison de leur structure, ils permettent une excellente agglutination et ont un haut niveau de cytotoxicité. Ce phénomène est utilisé en particulier dans les techniques de diagnostic sérologique. Leur persistance est soumise à un niveau élevé

de variation individuelle et peut être d'une année dans la plupart des cas, grâce à l'utilisation de techniques de détection de plus en plus sensibles (Filisetti and Candolfi, 2004).

Les IgG sont les deuxièmes immunoglobulines à apparaître dans la toxoplasmose. Il y a quatre sous-classes, qui apparaissent dans des proportions inégales pendant la toxoplasmose. On pense que les IgG1, G2 et G3 prédominent. Ils permettent également la cytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC) ou l'opsonisation, grâce aux récepteurs Fc existant sur les macrophages monocytaires et les cellules polynucléaires ou à la cytolyse médiée par le complément ou par une cellule NK. Ils jouent un rôle dans la protection du fœtus parce qu'ils sont capables de traverser le placenta. Les principaux antigènes cibles des IgG sont les antigènes de surface du parasite.Les IgA sont observées sous deux formes: IgA muqueuses apparaissant dans les sécrétions muqueuses et IgA sérique. Dans la toxoplasmose, les deux types d'IgA se trouvent à la fois dans le tube digestif et le sérum chez les animaux et les humains (Pinon et al., 2001).

5. Epidémiologie de la toxoplasmose

L'extension de l'infection des chats à *T.gondii* dépend de l'existence des oiseaux et des mammifères infectés. Ces derniers deviennent infectés en ingérant des oocystes. La prévalence à *T.gondii* est élevée chez les chats vivants dans les zones rurales par rapport à ceux vivant dans les zones urbaines. De même, la prévalence est également élevée chez les chats errants comparativement aux chats domestiques. Il n'existe pas de données sur l'importance relative des différents hôtes intermédiaires en tant que sources d'infection pour les chats.

Les rongeurs infectés par le *T.gondii* deviennent moins néophobes, ce qui entraîne une diminution de l'aversion pour l'odeur des chats. L'hypothèse que *T.gondii* peut manipuler le comportement de ses hôtes à ses propres avantages est fascinante. Ce comportement pourrait aider à s'assurer que les rongeurs seraient mangés par les chats et le cycle de vie serait préservé (Webster, 2007)(Gatkowska et al., 2012)(Barford, 2013).

Des enquêtes sérologiques comparant l'infection chez des personnes ayant eu ou non contact avec des chats ont cependant donné des résultats équivoques. Certains ont trouvé une association, d'autres non. La raison peut résider dans les questions posées et le groupe d'âge étudié, par exemple, le chat d'un voisin peut être aussi dangereux que le chat du propriétaire, et ce n'est pas le contact du chat qui importe, mais le contact avec les oocystes dans les

excréments de chat qui est un danger universel. Les fèces félines sont généralement dures et peuvent rester confinées aux zones de défécation pendant une longue période (Tenter et al., 2000)(Hill and Dubey, 2002)(Robert-Gangneux and Dardé, 2012).

Comme dit précédemment, les oocystes sporulés survivent pendant de longues périodes dans des conditions environnementales modérées. On ne sait pas si les fruits et les légumes sont contaminés par des oocystes de *T.gondii*. Les humains peuvent acquérir la toxoplasmose par les chiens de compagnie, qui ont roulé dans les fèces de chats infectés, et des oocystes ont été trouvés dans les fèces de chien (Dubey et al., 1970)(Etheredge et al., 2004)(Lopes et al., 2014).

L'infection à *T. gondii* chez l'homme et les animaux est répandue dans le monde entier, mais varie dans différentes zones géographiques d'un pays. Les causes de ces variations ne sont pas bien connues. Les conditions environnementales peuvent déterminer le degré de propagation naturelle de l'infection par *T. gondii*. L'infection est plus fréquente dans les régions basses à climat chaud que dans les régions de montagne à climats froids. Aussi plus fréquente dans les zones humides que dans les zones sèches. Ceci est probablement lié à des conditions favorisant la sporulation et la survie des oocystes dans l'environnement (Dumètre and Dardé, 2003)(Robert-Gangneux and Dardé, 2012).

Les habitudes culturelles et l'hygiène peuvent jouer un rôle et non pas l'ethnicité ou la race des personnes. Manger des viandes crues ou mal cuites, est en partie lié à un niveau de vie élevé et il est plus répandu dans le monde occidental. La plupart des asiatiques cuisent bien leur viande. Les différences dans les habitudes culinaires pourraient expliquer en partie les faibles taux de prévalence de l'infection par *T. gondii* en Afrique et en Asie qu'en Europe et en Amérique. Aux États-Unis, le bœuf n'a pas été trouvé infecté par *T. gondii*. La volaille est habituellement bien cuite avant consommation. L'ingestion d'agneau est probablement une source importante d'infection à *T. gondii* dans de nombreux pays, en particulier en Europe (Dubey, 2010).

Le mode de transmission de la toxoplasmose chez l'Homme se fait soit par consommation de viande crue ou mal cuite contenant des kystes tissulaires soit par présence des oocystes sur les mains ou les légumes non lavés. Cependant la proportion de l'infection par *T. gondii* n'est pas connue; il semble probable que là où les chats défèquent, autour et même dans les maisons, comme au Costa Rica et au Brésil, les oocystes seront la principale source ; alors qu'à Paris, où les chats sont mieux contrôlés et où beaucoup de viande crue ou insuffisamment cuite est consommée, les kystes seront la principale source. Il sera peut-être possible à

l'avenir de différencier sérologiquement les deux types d'infection, en se basant sur des méthodes pour détecter les anticorps spécifiques au stade d'infection (Dubey, 2010).

L'incidence de la toxoplasmose sur le plan médical et sanitaire et son implication économique sur les animaux et l'homme est d'une importance non négligeable et devrait être considérée avec plus de vigilance.

L'importance sanitaire est liée aux différents troubles cliniques qu'engendre la maladie chez les espèces affectées. En effet, on sait que les mammifères et les oiseaux sont réceptifs au toxoplasme mais les troubles varient en fonction non seulement de l'espèce mais aussi de l'état sanitaire des individus atteints.

Du point de vue économique, les moutons et les chèvres sont les espèces qui subissent les pertes les plus lourdes. Dans les pays développés, avec des élevages de grande dimension, les pertes économiques sont considérables. Ces pertes liées à la toxoplasmose chez les ruminants domestiques sont essentiellement dues aux formes aiguës de la maladie qui entraînent des mortalités élevées. Quant aux morbidités, elles proviennent d'avortements répétés provoquant la baisse des naissances dans les élevages. La prédominance de l'infestation est liée à la pullulation des chats et en particulier des chats errants qui ont accès au pâturage des ovins et les animaux pâturant au ras du sol. Tous ces animaux ingèrent des oocystes rejetés(avec les fèces de chat.

Chez l'homme, en général la maladie clinique a une allure sporadique et son incidence est faible. L'importance économique réside essentiellement dans les dépenses liées aux frais de traitement des personnes séropositives ainsi que celles liées à l'infestation des enfants et aux séquelles que la maladie engendre chez eux (Laure, 2006)

6. Signes cliniques de la toxoplasmose féline

La toxoplasmose féline se traduit dans la majorité des cas, par une forme asymptomatique ou plus rarement accompagnée de troubles digestifs tels que diarrhées et vomissements.

Des formes aiguës extra-intestinales peuvent toutefois être observées avec hyperthermie, adénopathie, bronchopneumonie, atteintes hépatiques, nerveuses et cardiaques.

Chez le chat adulte, la toxoplasmose clinique est rare. Les manifestations cliniques se développent surtout chez les jeunes (immunologiquement fragiles) ou chez les animaux ayant une immunité compromise par une maladie ou un traitement (Lindsay et al., 1995)(Elmore et al., 2010)

Les signes cliniques sont l'expression de processus inflammatoires dans le foie, les poumons et le système nerveux central qui provoque ascite, léthargie, dépression, hypothermie, jusqu'à l'apparition de la mort subite. Certains chatons peuvent développer la choriorétinite comme seul signe, accompagné dans certains cas par une uvéite antérieure transitoire**.** Chez les chats adultes, les signes cliniques peuvent être le résultat de la propagation des tachyzoïtes, à la suite d'une exposition aiguë ou de la réactivation d'une infection chronique (libération de bradyzoïtes) dans des conditions d'immunosuppression sévère (Elmore et al., 2010).

7. Diagnostic biologique

L'infection par *T. gondii* ne présente généralement aucun symptôme clinique chez la plupart des individus, de ce fait, le diagnostic repose principalement sur des tests sérologiques.

7.1. Diagnostic direct

7.1.1. Diagnostic microscopique

La détection de *T. gondii* dans les échantillons de matières fécales, d'eau de l'environnement et de tissus a toujours été basée sur un examen direct au microscope. Cependant, l'identification basée sur la microscopie optique seule, n'est pas sensible et donc peu fiable. La recherche des oocystes dans les fèces, l'eau et l'environnement peut être plus sensible sur des prélèvements effectués à partir de grands volumes d'échantillons par filtration ou après centrifugation; et les kystes tissulaires peuvent être colorés, ce qui permet de distinguer les parasites des cellules hôtes. Ces méthodes prennent relativement beaucoup de temps et nécessitent des compétences considérables pour obtenir des résultats de détection fiables.

Le microscope électronique est également employé pour détecter les kystes tissulaires dans le cerveau de la souris et pour détecter les oocystes dans l'intestin grêle des chats infectés. Cependant l'étude avec le microscope électronique est difficile pour une utilisation de routine (Hutchison et al., 1979)(Sims et al., 1989).

7.1.2. Inoculation aux animaux

L'isolement de *T. gondii* par bio-essai à l'aide d'animaux de laboratoire est généralement considéré comme une référence pour la détection de l'infection par *T. gondii*.

Les sécrétions, les excrétions, les liquides organiques, les ganglions lymphatiques, les tissus musculaires et cérébraux sont des spécimens possibles à utiliser pour l'isolement (Dubey et al., 2013). Les souris et les chats sont couramment utilisés pour les bio-essais biologiques de

T. gondii. Pour obtenir un taux de succès plus élevé dans l'isolement de *T. gondii*, les souris knock-out INF-gamma sont préférées, en raison de leur sensibilité élevée à l'infection par *T. gondii*. Chez des souris normales, une dépression du système immunitaire peut être provoquée en administrant du dexaméthasone (10 à 15 µg / ml) dans l'eau potable au cours du bio-essai pour augmenter le taux de succès. Dans l'ensemble, le dosage biologique est coûteux et prend du temps (nécessite habituellement 6 semaines). Ainsi, il ne peut pas être utilisé pour un dépistage à grande échelle (Liu et al., 2015).

7.2. Diagnostic indirect (techniques sérologiques)

7.2.1. Dye test (DT) appelé également test de lyse

le Dye Test, d'abord développé par Sabin et Feldman en 1948, a été considéré comme le test de référence pour la détection des IgG anti-*T. gondii.* chez l'homme (Reiter-Owona et al., 1999).Le DT est à la fois très spécifique et sensible chez l'homme, mais peut ne pas être fiable chez les bovins et les espèces aviaires. L'inconvénient majeur du DT est la nécessité des parasites vivants et un sérum humain sain comme facteur accessoire, ce qui limite fortement la disponibilité du DT (Ashburn et al., 2001). Le test est potentiellement dangereux, à cause de manipulation de souches de toxoplasmes vivantes virulentes et requiert un haut niveau d'expertise technique, qui ne peut être réalisé que dans des laboratoires de référence. Bien que les tachyzoïtes préparés à partir de la culture cellulaire puissent être utilisés de façon courante dans le DT, les résultats faussement négatifs peuvent se produire dans certains cas (Udonsom et al., 2010).

7.2.2. Test d'agglutination modifié (MAT) (voir partie expérimentale)

7.2.3. Test d'agglutination au latex (LAT)

Le principe de ce test est qu'on applique l'antigène soluble sur des particules de latex, on observe alors l'agglutination lorsque le sérum positif est ajouté. LAT est rapide et facile à effectuer pour détecter les IgG anti-*T.gondii*, il a une sensibilité de 86-94% et une spécificité de 100% chez l'homme, une faible sensibilité de 78,6% et une spécificité de 61,9% chez les ovins (Oncel et al., 2005). Ainsi, le LAT est souvent utilisé comme outil de dépistage dans le cadre d'une enquête épidémiologique en raison de la simplicité de la performance, mais le résultat positif nécessite un examen plus poussé à l'aide d'autres tests sérologiques (Holliman et al., 1990).

7.2.4.Test d'immunofluorescence indirect(IFAT)

L'IFAT est un test simple qui détecte à la fois les anticorps IgG et IgM et a été largement utilisé dans la détection des anticorps de *T. gondii* chez l'homme et l'animal (Sucilathangam et al., 2010). Les tachyzoïtes tués de *T. gondii* sont incubés avec le sérum à tester, les anticorps anti-espèces fluorescents sont ajoutés et le résultat est lu sous un microscope à fluorescence. Le test présente des sensibilités de 80,4 à 100% et des spécificités de 91,4 à 95,8% (dos Santos et al., 2010).Des anticorps marqués par fluorescence pour une variété d'espèces sont disponibles dans le commerce, et le procédé est relativement peu coûteux. Cependant, un microscope à fluorescence est nécessaire pour le test (Liu et al., 2015).

7.2.5. Test immunoenzymatique (ELISA)

Différents types d'ELISA ont été mis au point pour détecter les anticorps ou antigènes de *T. gondii*, tels que ELISA indirect et ELISA sandwich. Dans l'ELISA indirect, l'antigène est appliqué sur la phase solide et l'échantillon contenant des anticorps est ajouté. La réaction antigène-anticorps est renforcée par l'addition d'un anticorps secondaire lié à une enzyme. Cette réaction peut être évaluée par quantification de la couleur qui se développe. Les tests sont presque tous utilisés pour détecter les IgG , IgM et IgA plutôt que des antigènes (Liu et al., 2015). Dans l'ELISA sandwich, les antigènes ou anticorps sont appliqués sur la phase solide et l'échantillon contenant des anticorps ou des antigènes est ajouté. Après incubation et lavage, le complexe anticorps-antigène est attaché à la phase solide. Les anticorps ou antigènes capturés sont détectés par l'addition d'antigènes ou d'anticorps spécifiques marqués par une enzyme. L'ELISA sandwich a été développé pour détecter les anticorps et antigènes de *T. gondii* (Liu et al., 2015).

7.3. Méthodes moléculaires basées sur la détection d'acides nucléiques parasitaires

7.3.1.PCR conventionnelle

En raison des limites inhérentes aux méthodes de diagnostic traditionnelles, la PCR peut être utilisée en plus de la sérologie pour diagnostiquer l'infection par *T. gondii*. La PCR est une méthode d'amplification enzymatique in vitro efficace qui permet une amplification spécifique de l'ADN à partir de petites quantités de matériaux de départ en peu de temps.

Pour obtenir une sensibilité élevée, plusieurs gènes de ciblage multicopie sont habituellement utilisés pour la détection de *T. gondii* dans des échantillons biologiques, y compris le gène B1, l'élément répétitif 529 pb et les séquences 18S rDNA. Plusieurs autres gènes à copie unique,

tels que SAG1, SAG2 et GRA1, ont également été utilisés comme cibles PCR dans certains laboratoires (Liu et al., 2015).

7.3.2. PCR en temps réel (voir partie expérimentale)

7.4.Méthodes de génotypage basées sur les technologies moléculaires

Pour les études épidémiologiques, il est important d'identifier les génotypes de l'infection par *T. gondii*, et certaines technologies moléculaires, y compris l'analyse par microsatellites, le typage de séquences multilocus, la PCR-RFLP et d'autres techniques ont été développées (Liu et al., 2015).

7.4.1. Analyse par microsatellite (voir partie expérimentale)

7.4.2. Typage de séquences Multilocus (MLST)

Le typage de séquences à multiples séquences (MLST) est basé sur des polymorphismes de séquence d'ADN, incluant les polymorphismes de nucléotides simples (SNP), et la délétion et l'insertion de nucléotides, qui a la plus haute résolution parmi toutes les méthodes de typage quand l'ADN génomique est suffisamment disponible (Su et al., 2010).Cependant, cette approche n'est pas un bon choix pour les échantillons cliniques, car une grande quantité d'ADN génomique est nécessaire pour ce test (Liu et al., 2015).

7.4.3.PCR-RFLP

La PCR-RFLP est basée sur la capacité des endonucléases de restriction à reconnaître les SNP, à digérer les produits de PCR et à afficher ensuite des motifs de bandes d'ADN distincts sur l'électrophorèse des gels d'agarose. How et Sibley ont identifié 3 lignées prédominantes (types I, II et III) à partir de 106 isolats de *T. gondii* provenant d'humains et d'animaux par PCR-RFLP en utilisant 6 marqueurs (D. K. Howe and Sibley, 1995).

Depuis , plusieurs séries différentes de marqueurs PCR-RFLP multilocus ont été utilisées pour caractériser individuellement les isolats de *T. gondii* dans différents laboratoires (Ferreira et al., 2008). La PCR-RFLP multilocus classique repose sur des séquences d'ADN polymorphe à une seule copie, et nécessite habituellement une quantité relativement importante d'ADN parasitaire. Ainsi, il est difficile de génotyper *T. gondii* dans des échantillons biologiques, en raison de l'ADN parasitaire limité (Liu et al., 2015).

Partie expérimentale

1. Matériels et méthodes

1.1. Éthique

Dans le cadre du Programme national de lutte contre la rage, Hygiène Urbaine d'Alger (HURBAL) est chargée de capturer des chats errants et des chiens de la région d'Alger.

Ce programme est réalisé par HURBAL, institution fiduciaire du Ministère algérien de l'Intérieur, de l'Administration Locale et du Ministère Algérien de l'Agriculture et du Développement Rural. Deux autres vétérinaires sont chargés d'assurer la bonne santé des animaux capturés. Les chats sont pris avec précaution avec pince à gaine. Une fois capturés, les animaux sont logés dans des cages régulièrement nettoyées et désinfectées. Ils sont euthanasiés seulement après l'expiration du délai légal de garde (les propriétaires ont sept jours pour réclamer leurs animaux).

1.2. Lieu d'étude et échantillonnage

Nous avons récolté des échantillons de sang et d'organes (cœur, rate et langue) provenant de 96 chats errants (63 mâles et 33 femelles) vivant dans la wilaya d'Alger. Ces échantillons ont été prélevés pendant les mois de juillet et août 2015.

Les prélèvements sont réalisés au niveau de la fourrière canine de la wilaya d'Alger, .(latitude 36° 42′00″ N, longitude 3° 13′ 00″ E). qui ne dispose que d'une seule fourrière canine située dans la commune d'El-Harrach et dépendant du bureau d'hygiène communal de la ville d'Alger (HURBAL). Elle est en activité depuis plus d'un siècle et ayant en charge la lutte contre les zoonoses qui présentent un problème de santé publique.
La fourrière a pour rôle de :

- Capturer et de prendre en charge les animaux dangereux ou errants ;
- Mettre en observation les animaux suspects de maladies contagieuses telle que la rage ;
- Euthanasier ces animaux en cas de maladies incurables ou sénilité ;
- Restituer les animaux capturés réclamés par leurs propriétaires ;
- Abattre et enfouir les animaux morts après chaulage.

Pour capturer les chiens et les chats errants, les agents interviennent dans les voies publiques au niveau de 57 communes de la wilaya d'Alger en collaboration avec les bureaux

communaux d'hygiène, les collectivités (hôpitaux, hôtels, cités universitaires, sociétés privées et étatiques), et au domicile des citoyens(Benjaballah, 2006).

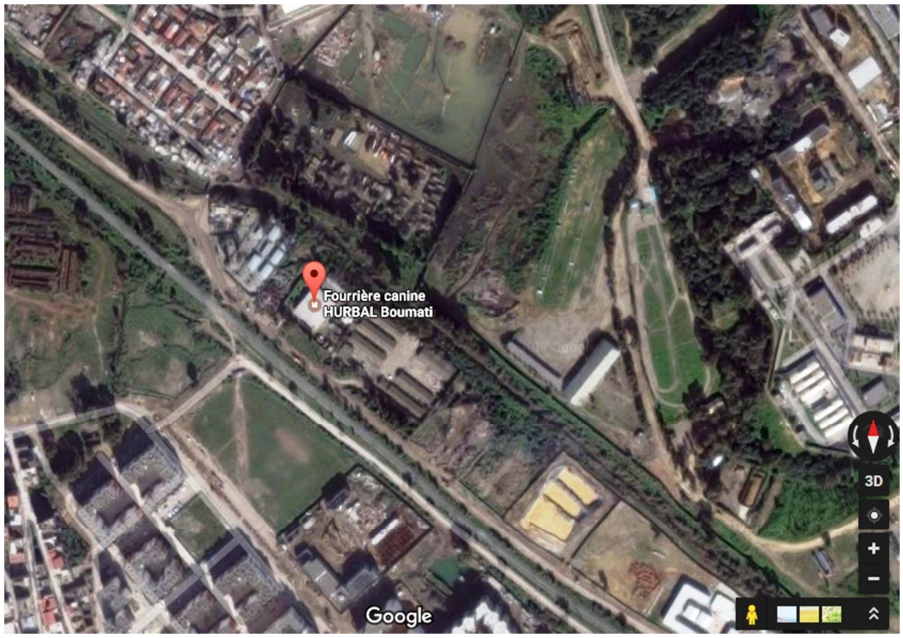


Figure 8 : Fourrière canine d'Alger (source : Googleearth)

L'échantillonnage est effectué dans une salle dédiée aux activités vétérinaires.
Des échantillons d'organes sont prélevés immédiatement après l'euthanasie des animaux.
L'âge approximatif de chaque chat est estimé sur la base de la dentition. Les chats sont classés comme juvéniles (<1 an), sous-adultes (1 an-2 ans) et adultes (> 2 ans) (García-Bocanegra et al., 2010). Le sexe est également enregistré pour chaque animal.
Les sérums sont séparés du caillot sanguin par centrifugation pendant 10 min à 1900 g et stockés avec des échantillons de cœur, de rate et de langue à -20 ° C jusqu'à l'analyse.

Ensuite tous les échantillons ont été envoyés avec de la carboglace pour être traités dans les centres nationaux français de référence de la toxoplasmose :

- Reims pour les examens sérologiques et l'extraction d'ADN.
- Limoges pour les analyses de génotypage.

1.3. Examen sérologique

La recherche des anticorps spécifiques, simple à réaliser peut apporter un diagnostic de certitude en raison de la spécificité des différentes techniques. De plus, elle permet l'étude des différents types d'anticorps (IgG, IgM, IgA, IgE). Une bonne connaissance de la cinétique d'évolution de ces anticorps est nécessaire pour interpréter correctement une sérologie de la toxoplasmose.

-Les anticorps IgM sont détectables environ une semaine après l'infection, elles vont augmenter pour atteindre leur maximum en 2 à 3 semaines, puis diminuer plus lentement, pour disparaitre en général en 5 à 6 mois, mais peuvent persister plusieurs mois voire plus d'une année, avec des techniques très sensibles.

-Les IgG spécifiques sont détectées environ une semaine après les IgM, elles vont augmenter rapidement, pour atteindre un taux maximal en deux mois, qui restent en plateau à un taux élevé pendant plusieurs mois puis s'abaissent lentement et persistent à un taux faible, témoin d'une infection toxoplasmique ancienne.

Ainsi, la détection des anticorps IgM seuls est insuffisante pour l'établissement d'une infection aiguë. Le dosage respectif des IgM et des IgG spécifiques est nécessaire pour dater l'infection.

-Les anticorps IgA sont considérés comme un marqueur de l'infection aiguë, qui sont produits plus tôt que les IgM, et peuvent persister pendant plusieurs mois, elles ne sont pas recherchées systématiquement, mais peuvent être d'une grande aide pour la confirmation d'une séroconversion toxoplasmique récente ou d'une réactivation sérologique (Liu et al., 2015)

Pour la mise en évidence ou le dosage de ces différentes classes d'immunoglobulines de nombreuses techniques sérologiques peuvent être utilisées. Nous avons opté pour le test d'agglutination modifié (MAT) ou connu aussi sous le nom d'agglutination direct haute sensibilité (ADHS)

Test d'agglutination modifié (MAT)

Les échantillons de sérum sont décongelés et testés pour la présence d'anticorps IgG spécifiques de *T. gondii* avec le test d'agglutination modifié (MAT) (Dubey and Desmonts, 1987). Les sérums de chats sont testés en utilisant des dilutions allant de 1: 6 à 1: 12800.

La dilution 1: 6 a été choisie comme limite de positivité. Pour le test MAT, des tachyzoïtes de *T. gondii* fixés au formol sont ajoutés à des plaques de microtitrage en forme de U et des sérums à tester dilués sont ensuite ajoutés(Desmonts and Remington, 1980). Ce test a d'abord été décrit par Fulton et Turk, avec une spécificité et une sensibilité faibles, en raison de la liaison des IgM normales à la surface du parasite et amélioré en préparant l'antigène en utilisant un tampon contenant du 2 mercaptoéthanol pour éliminer les IgM non spécifiques. Ce test détecte les anticorps IgG, chez n'importe quelle espèce hôte, et peut être utilisé sur les sérums hémolysés. Cependant des résultats faux négatifs peuvent se produire au cours des premiers stades de l'infection aiguë(Zhu et al., 2012)(Liu et al., 2015).Le test MAT est simple et précis, il est commode à la fois pour le diagnostic de laboratoire et pour les enquêtes épidémiologiques (Liu et al., 2015).

Principe du test MAT

-Mettre à température ambiante les différents réactifs à utiliser :

-PBS PH 7.2 Biomerieux

-BABS Biomerieux

-Antigène figuré (tachyzoïte entier formolé à partir de la souche I (RH))

-Solution mère de dithiothréitol 1M (7.725 g de DTT+ 0.04 g d'acétate de sodium qsp 50 ml avec de l'eau Mili Q puis filtrer sur 0.45 µ et congeler sous 1ml)

-Préparer la dilution d'antigène figuré au 1/17 extemporanément en tampon BABS Biomerieux (si flacon d'antigène neuf, agiter le flacon, ajouter 5µl de formol dans 10 ml d'antigène et réagiter. Ce flacon ainsi formolé sera gardé à 4°C jusqu'à l'utilisation complète du flacon)

-Dilution des sérums en PBS PH 7,2 Biomerieux au 1/3 (25µl de sérum+ 50µl de PBS)

-préparation du dithiothréitol (solution mère) au 1/50 en PBS PH 7.2

Mode opératoire

-Déposer 25µl de dilution de sérum au 1/ 3 dans la première cupule de la plaque

-Distribuer 25µl de dithiothréitol (DTT) dilué au 1/50 dans toute la ligne de la plaque

-Faire une dilution sériée de ½ en ½ sur toute la ligne

-Distribuer 25µl d'antigène dilué au 1/17 sur toute la ligne

-Homogénéiser la plaque

-La recouvrir d'un film adhésif pour éviter l'évaporation

-Incuber toute la nuit à température ambiante à l'abri des vibrations

-Lecture le lendemain

-Le résultat sera rendu en dilution, soit respectivement le premier puits=1/6, deuxième=1 /12 …etc.

-Un résultat est considéré positif lorsque il y'a un voile d'agglutination sur toute la cupule ou si le voile d'agglutination couvre la moitié ou plus la cupule (≥50 %).

-Un résultat est considéré négatif lorsqu'il y a un voile de sédimentation des tachyzoïtes ou si il y'a un voile d'agglutination inférieur à (<50 %) de la cupule. Les résultats trouvés pour chaque prélèvement sont mentionnés sur le tableau du MAT (voir annexe 1)

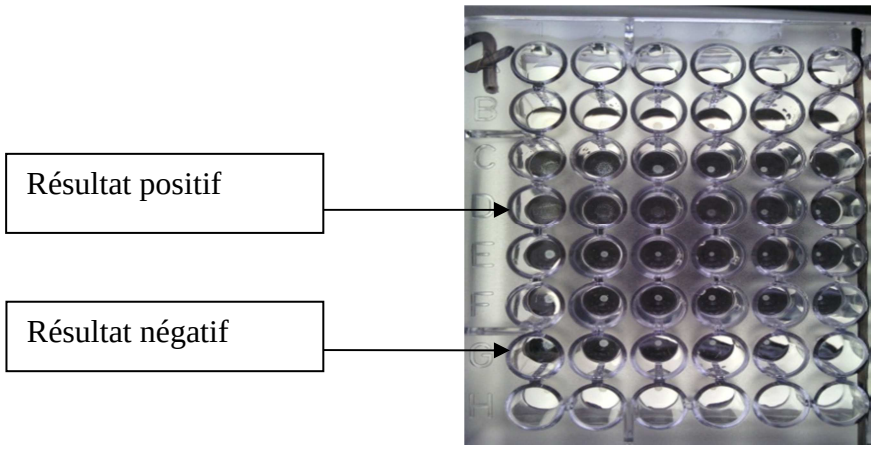


Figure 9 : Résultats sérologiques d'agglutination des prélèvements sur plaque avec le test MAT (photo personnelle).

1.4. Méthodes moléculaires

1.4.1. Extraction d'ADN

Après décongélation, nous avons analysé le cœur entier de chaque chat, et nous avons étudié aussi la rate et la langue uniquement chez les chats dont la sérologie est positive.

Pour l'analyse, les organes sont traités avec de la trypsine avec le protocole suivant :

- Peser les organes et préparer la solution de trypsine (T4674 SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, France) dilué au1/10 (20 ml trypsine et 180 ml d'eau physiologique) (200g d'organe pour 300ml de trypsine)

-Déposer séparément les organes dans le bol du mixeur et les broyer pendant environ 2mn

-Prendre la totalité du broyat et le mettre dans un erlenmeyer, ajouter 20 ml de solution de trypsine diluée (concentration finale 0,25%).et un barreau aimanté,

-Bien homogénéiser et boucher l'erlenmeyer, avec du papier d'aluminium

-Mettre sous agitation à l'étuve pendant 90 minutes à 37 ° C

-Une fois le traitement à la trysine terminé, filtré la totalité dans un autre erlenmeyer, à l'aide d'un entonnoir et de 2 épaisseurs de gaze

-Bien presser la gaze à la main pour récupérer le maximum de filtrat

-Mettre le filtrat dans un tube de 50 ml en plastique

-Centrifuger 10 min à 1900 g

-Retirer le surnageant

-Faire deux lavages en eau physiologique (10min à 1900 g)

-Récupérer les culots dans un tube de 15 ml en rinçant les tubes de 50ml et centrifuger 10min à 1900 g (troisième lavage)

-Ecarter 300 µl d'homogénat dans un tube conique pour PCR, et les conserver à -80 ° C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

L'extraction de l'ADN est effectuée avec le kit EZ1 DNA tissus (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fabricant. Comme recommandé:

-Décongélation des tubes contenant 300 µl d'homogénat à température ambiante

-Ajouter 1ml de tampon Tris EDTA à [x1] (lavage en tampon) sous une hotte poste de sécurité microbiologique pour éviter les contaminations

-Bien homogénéiser la solution et centrifuger à 18090 g pendant 5 min.

-Après centrifugation enlever le surnageant et ajouter au culot10 µl de solution de protéinase K et 190 µl de tampon G2

-Bien homogénéiser la solution de 200 µl et la mettre à incuber dans un bloc chauffant (bain sec) à 56 ° C pendant 90 minutes ou plus jusqu'à la lyse complète.

-200µl d'échantillon lysé sont transférés dans un nouveau tube d'ADN de 2 ml.

Les étapes d'extraction et de purification sont effectuées par l'extracteur automatisé d'ADN BioRobot EZ1 (Qiagen). Les étapes d'extraction d'ADN comprennent :

-La lyse de l'échantillon

-La liaison de l'acide nucléique de l'échantillon à des particules magnétiques

- Enfin, le lavage et l'élution de100 µl d'acides nucléiques (ADN), et la conservation à -80 ° C jusqu'à utilisation ultérieure

Le kit DNA EZ1 tissus (voir annexe 2) est destiné à la purification d'ADN génomique à partir de tissus et d'autres échantillons. La technologie des particules magnétiques fournit un ADN

de haute qualité adapté à une utilisation directe dans les applications en aval telles que l'amplification ou d'autres réactions enzymatiques.

L'instrument EZ1 effectue toutes les étapes de la procédure de préparation de l'échantillon, et la procédure peut être augmentée ou réduite, ce qui permet une purification à partir de quantités variables de matière de départ **(**voir annexe 3)

Figure 10 : Extracteur automatisé d'ADN BioRobot EZ1 (Qiagen) (photo personnelle)

1.4.2. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les ADN extraits des échantillons de cœur, de rate et de langue sont testés par PCR quantitative en temps réel avec une sonde marquée sur un thermocycleur (Bio-Rad iQ5) (Foster, Californie, Etats-Unis) ciblant l'élément répétitif AF146527 de 529 pb de *T. gondii*(De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012).

Les amorces de séquence sens et anti-sens sont 5'-CGGAGAGGGAGAAGATGTT-3 'et 5'-GCCATCACCACGAGGAAA-3', respectivement. La sonde utilisée est 5'-FAM-CTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGG-BHQ1-3 '(De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012).

Mode opératoire (qPCR)

-Décongeler les échantillons contenant l'extraction d'ADN (tube à vis de 100 µl)

-Décongeler les réactifs pour PCR : amorce sens et anti-sens, sonde, platinum UDG (Platinum supermix UDG®, Invitrogen, Paisley, UK) qui contient : tampon, dATP, dCTP, dGTP, dUTP-MgCl2-Taq polymérase.

-Préparer un volume total de chaque réactif de PCR (ADN et le mix), de sorte que Chaque réaction de PCR contient 10 µl d'ADN extrait, mélangé à 15 µl d'un mélange PCR (PCR mix) contenant 12,5 µl de platinum UDG (Platinumsupermix UDG®, Invitrogen, Paisley, UK), à une concentration de 3 mM MgCl2, 0,5 µl de chaque amorce à une concentration de 20 µM, 0,5 µl de sonde marquée à une concentration de 2 µM.

-Placer la plaque de PCR à 96 puits et à l'aide d'une micropipette, remplir les puits avec un volume de 15 µl mix.

-Ajouter de l'eau au puits consacré pour le témoin négatif

- Ajouter dans chaque puits10 µl d'ADN extrait

-Ajouter de l'ADN extrait des tachyzoïtes cultivés (souche RH) au puits consacré pour le témoin positif

-Refermer les puits avec un film pour empêcher l'évaporation.

- Déposer cette plaque dans le thermocycleur (Bio-Rad iQ5) (Foster city, California, USA) et faire correspondre toutes les données du plan de la plaque de PCR au logiciel.

-Programmation du cycle de température :

- étape 1 : décontamination initiale par UDG à 50 °C pendant 2 min pour empêcher l'amplification des produits de PCR contaminants et dénaturation à 95 ° C pendant 2 min pour inactiver l'UDG
- étape 2 : dénaturation pour chaque cycle (45cycles) à 95 ° C pendant 15 s
- étape 3 : hybridation/ élongation à 60 ° C pendant 1 min.
- Les résultats sont analysés avec le logiciel iCycler.

Figure 11: Thermocycleur (Bio-Rad iQ5) (photo personnelle).

Principe de (qPCR)

La PCR quantitative en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique, excepté qu'elle nécessite l'utilisation d'une sonde en plus des deux amorces. Il existe différents systèmes de détection quantitative des amplicons (SYBR Green, Hydrolyse de sondes TaqMan assay, Hybridation de 2 sondes, Balises moléculaires). Nous avons analysé nos échantillons avec la PCR quantitative en temps réel avec utilisation d'une sonde TaqMan.

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfert son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence résonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence(Mackay et al., 2002).

Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise.

Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives.

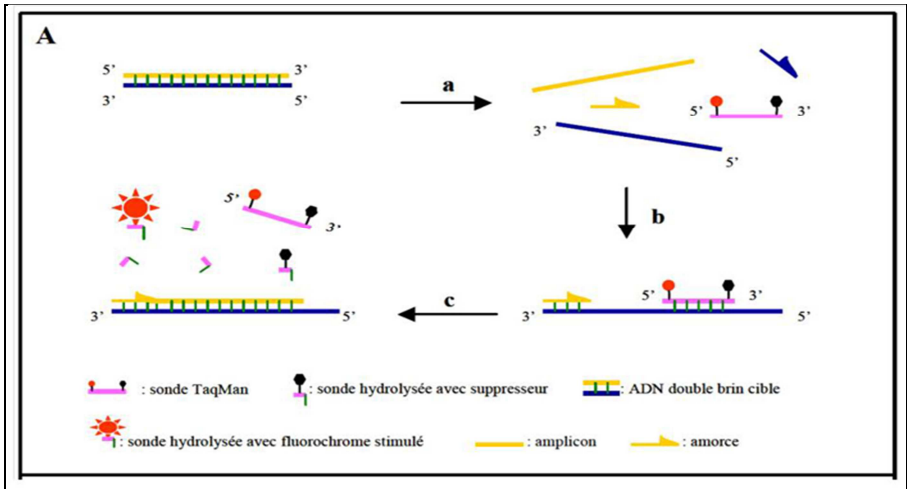
A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement

du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde(Poitras and Houde, 2002).

L'émission de fluorescence enregistrée à la fin de chaque cycle de PCR permet de définir une valeur de Ct (cycle threshold ou cycle seuil) correspondant au nombre de cycles de PCR à partir duquel la valeur de l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond. La valeur du Ct est d'autant plus faible que le nombre initial de copies de la séquence cible est grand(Higuchi et al., 1993).

L'utilisation d'une sonde TaqMan en plus des deux amorces augmente fortement la spécificité des amplicons générés.

Les avantages de la PCR quantitative en temps réel sont sa rapidité de mise en œuvre et un risque nul de contamination post-PCR du fait que les tubes ne sont pas ouverts après amplification. Les risques de contamination pré-PCR par de l'ADN étranger lors des étapes d'extraction et de purification de l'ADN et/ou de préparation des réactions de PCR sont cependant les mêmes que pour la PCR conventionnelle. En revanche, la PCR quantitative en temps réel est très sensible à la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase (tel que polysaccharides, protéines, solvants organiques.), ce qui nécessite de veiller à la pureté des ADN extraits.



Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: TaqMan® assay)
(**a**) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.
(**b**) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute.
(**c**) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Schéma extrait de l'article de Elyse Poitras et Alain Houde dans Reviews In Biology and Biotechnology Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11

Figure 12 : schéma des principales étapes de la qPCR avec utilisation d'une sonde TaqMan

1.4.3. Analyse génotypique

L'ADN de *T. gondii* des échantillons de cœurs ayant une valeur de cycle de quantification (Cq) <30 par qPCR a été soumise à une analyse de génotypage à l'aide de 15 marqueurs de microsatellites (TUB2, W35,TgM-A, B18, B17, M33, IV.1, XI, M48, M102, N60, N82, AA, N61 et N83) dans un test de PCR multiplex décrit précédemment par Ajzenberg(Ajzenberg et al., 2010).

Au cours de l'analyse, en plus de nos nouveaux échantillons d'ADN, plusieurs souches de référence sont analysées en parallèle, les souches de référence pour :

-le Type I (TgA00004 = GT1),

-le Type II (Me49)

-le Type III (CTG)

- et une autre souche de référence originaire d'Afrique [Souche Africa 1 (TgA15004 = GAB2-2007-GAL-DOM2)] (Dubey, 1992; Lunde and Jacobs, 1983; Mercier et al., 2010; Pfefferkorn et al., 1977; Su et al., 2012).

En bref, dans chaque paire d'amorces, l'amorce sens est marquée à l'extrémité 5 'avec de la fluorescéine pour permettre l'encollage des produits de PCR soumis à une électrophorèse dans un séquenceur automatique.

La PCR est réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µl consistant en 12,5 µl de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, France), 5 pmol de chaque amorce et 5 µl d'ADN. Les conditions cycliques sont:

-15 min à 95ºC (dénaturation initiale);

-30 s à 94ºC, 3 min à 61ºC et 30 s à 72ºC (35 cycles);

- et 30 min à 60 ° C (élongation finale).

Un µl de chaque produit de PCR est mélangé directement avec 0,5 µl d'un étalon de taille marqué par un colorant (ROX 500, Applied Biosystems) et 23,5 µl de formamide désionisé.

Ce mélange est dénaturé à 95 ° C pendant 5 min puis soumis à une électrophorèse en utilisant un séquenceur automatique (ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems).

Les tailles des allèles en paires de bases (pb) sont estimées à l'aide du logiciel d'analyse Gene Mapper (version 4.0, Applied Biosystems).

Principe des microsatellites

Les séquences de microsatellites (MS) sont des répétitions en tandem de motifs d'ADN courts (1 à 6 pb) qui sont omniprésents dans les génomes eucaryotes et subissent des changements de longueur en raison de l'insertion ou de la suppression d'une ou plusieurs unités répétées.

Le mécanisme de mutation le plus couramment proposé pour les séquences de MS est le glissement des brins, qui se produit principalement pendant la réplication. Les nombres de motifs répétés diffèrent dans une population, créant ainsi des allèles multiples à un locus MS. Les répétitions en tandem dans *T. gondii* sont souvent simples, et composées avec aussi peu que 2 nucléotides, et se produisent 2-20 fois.

Ajzenberg et al. Ont mis au point une méthode facile à utiliser pour le génotypage de *T. gondii* dans un seul test PCR multiplex utilisant 15 marqueurs microsatellites.

Les loci MS sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces sens marquées par fluorescence et d'amorces anti-sens non marquées. Les produits marqués par colorant sont séparés par taille en utilisant une électrophorèse automatisée et identifiés par détection de fluorescence.

Le résultat du génotypage avec 15 marqueurs microsatellites montre que les 8 marqueurs MS (TUB2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1 et XI.1) pourraient différencier les types I, II et III de tous les génotypes atypiques et les 7 autres marqueurs (M48, M102, N60, N82, AA, N61 et N83) pourraient améliorer la résolution génétique en différenciant les isolats au sein d'un haplogroupe ou d'une lignée clonale (Ajzenberg et al., 2010).

Cette technique est une méthode de génotypage rapide et facile à utiliser qui vise à assurer à la fois les niveaux de discrimination génétique des isolats de *T. gondii* dans un seul test de PCR multiplex en utilisant 15 marqueurs MS situés sur 11 chromosomes différents de *T. gondii* (Ajzenberg et al., 2010).

Tableau 1 : Marqueurs microsatellites et amorces PCR utilisés pour le test de PCR multiplex(Ajzenberg et al., 2010).

Marker	Chromosome (position)[a]	Repeat motif(s)	Primer sequence[b]	Size range (bp)
TUB2	IX (974608 to 974896)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-GTCCGGGTGTTCCTACAAAA 3′ (R) 5′ TTGGCCAAAGACGAAGTTGT 3′	287–291
W35	II (633241 to 633482)	[TC/AG]$_n$, [TG/AC]$_n$	(F) 5′ HEX-GGTTCACTGGATCTTCTCCAA 3′ (R) 5′ AATGAACGTCGCTTGTTTCC 3′	242–248
TgM-A	X (4824879 to 4825083)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ HEX-GGCGTCGACATGAGTTTCTC 3′ (R) 5′ TGGGCATGTAAATGTAGAGATG 3′	203–211
B18	VIIa (2921536 to 2921693)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-TGGTCTTCACCCTTTCATCC 3′ (R) 5′ AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA 3′	156–170
B17	XII (6474746 to 6475079)	[TC/AG]$_n$	(F) 5′ HEX-AACAGACACCCGATGCCTAC 3′ (R) 5′ GGCAACAGGAGGTAGAGGAG 3′	334–366
M33	IV (672591 to 672760)	[TC/AG]$_n$	(F) 5′ 6-FAM- TACGCTTCGCATTGTACCAG 3′ (R) 5′ TCTTTTCTCCCCTTCGCTCT 3′	165–173
IV.1	IV (742419 to 742693)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ HEX-GAAGTTCGGCCTGTTCCTC 3′ (R) 5′ TCTGCCTGGAAAAGGAAAGA 3′	272–282
XI.1	XI (189702 to 190058)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-GCGTGTGACGAGTTCTGAAA 3′ (R) 5′ AAGTCCCCTGAAAAGCCAAT 3′	354–362
M48	Ia (332951 to 333166)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-AACATGTCGCGTAAGATTCG 3′ (R) 5′ CTCTTCACTGAGCGCCTTTC 3′	209–243
M102	VIIa (3093491 to 3093664)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ NED-CAGTCCAGGCATACCTCACC 3′ (R) 5′ CAATCCCAAAATCCCAAACC 3′	164–196
N60	Ib (1766079 to 1766221)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ NED-GAATCGTCGAGGTGCTATCC 3′ (R) 5′ AACGGTTGACCTGTGGCGAGT 3′	132–157
N82	XII (1621472 to 1621585)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ HEX-TGCGTGCTTGTCAGAGTTC 3′ (R) 5′ GCGTCCTTGACATGCACAT 3′	105–145
AA	VIII (5836880 to 5837144)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ NED-GATGTCCGGTCAATTTTGCT 3′ (R) 5′ GACGGGAAGGACAGAAACAC 3′	251–332
N61	VIIb (4217145 to 4217238)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-ATCGGCGGTGGTTGTAGAT 3′ (R) 5′ CCTGATGTTGATGTAAGGATGC 3′	79–123
N83	X (1772898 to 1773209)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-ATGGGTGAACAGCGTAGACA 3′ (R) 5′ GCAGGACGAAGAGGATGAGA 3′	306–338

[a]Basé sur la position dans chaque chromosome de la souche ME49 comme indiqué sur le site Web Toxo DB (http://toxodb.org).

[b](F), amorce sens; (R), amorce anti-sens. Dans chaque paire d'amorces, l'amorce sens est marquée à la fin 5 'avec de la flurorescéine: 6-carboxyfluorescéine (6-FAM) pour MS TUB2, XI.1, B18, N83, N61, M33 et M48, l'hexachlorofluorescéine (HEX) Pour MS TgM-A, B17, N82, W35 et IV.1, et 2, 7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein (NED) pour MS AA, N60 et M102.

1.5. Analyses statistiques

L'analyse statistique est réalisée à l'aide de SPSS Statistics 19.0. La signification statistique entre la séroprévalence et l'âge ou le sexe est évaluée par le test $\chi 2$.

Ces analyses sont considérées comme significatives lorsque p <0,05. Les intervalles de confiance (95%) sont calculés selon la méthode décrite par Toma (Toma et al., 1996).
L'accord entre les résultats qualitatifs obtenus à partir des tests sérologiques et qPCR est évalué en calculant le kappa de Cohen. L'accord avec des valeurs kappa de 0,00 à 0,20 est considéré comme léger, 0,21 à 0,40 juste, 0,41 à 0,60 modéré, 0,61 à 0,80 significatif et 0,81 à 1,00 presque parfait (Landis and Koch, 1977).

2. Résultats

2.1. Tests sérologiques

Les échantillons de sérums (n = 96) ont été testés pour la présence d'IgG spécifiques de *T. gondii* avec le test d'agglutination modifié (MAT), en utilisant 1: 6 comme seuil de positivité.

Tableau 2: Séroprévalence de *T. gondii* chez les chats errants

N°. Chats testés	N°. Chats séropo-sitifs	Nombre de sérums avec un titre MAT de :											
		6	10	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
96	48 (50%)	3 (3.1%)	4 (4.1%)	3 (3.1%)	2 (2.1%)	3 (3.1%)	2 (2.1%)	6 (6.2%)	2 (2.1%)	6 (6.2%)	7 (7.3%)	8 (8.3%)	2 (2.1%)

Nous avons trouvé des anticorps contre *T. gondii* chez 48 des 96 chats (50%) (CI = 40% - 60%), avec des titres entre 6 et 12800. La majorité des titres sont élevés entre 400 et 6400 **(tableau 2)** (plus de détails dans annexe 4).
Nous avons trouvé aussi des anticorps contre *T.gondii* chez 31 parmi 63 (49,2%) mâles et 17 parmi 33 (51,5%) femelles. Aucune différence statistiquement significative n'est observée entre la prévalence de l'infection et le sexe du chat (p> 0,05)

Tableau 3: Séroprévalence de *T. gondii* selon le sexe et l'âge des chats errants

catégorie	Chats examinés	Chats séropositifs	P (χ^2)	IC 95%[a]
Sexe				
Femelle	33	17 (51.5%)	0.8	36-66
Male	63	31 (49.2%)		38-60
Age (année)				
<1 (juvéniles)	25	2 (8.0%)		1-15
1-2 (sub-adultes)	40	25 (62.5%)	<0.005	49-75
>2 (adultes)	31	21 (67.7%)		52-82

[a]Intervalle de confiance à95%

Nous constatons la présence des anticorps contre *T.gondii* chez 2 parmi 25 (8%) chats juvéniles (<1 an), 25 parmi 40 (62,5%) chats sub-adultes (1 an-2 ans) et 21 parmi 31

(67,7 %) chats Adultes (> 2 ans). Les différences entre les catégories d'âge sont significatives (P <0,005) **(tableau 3).**

2.2. Détection et identification moléculaires

2.2.1. qPCR

Globalement, 87 des 96 cœurs (90,6%) recueillis et testés par qPCR s'avèrent positifs pour *T.gondii*, avec des valeurs de cycle de quantification (Cq) allant de 20,8 à 39,0 (voir annexe 5)

Tableau 4: Résultats d'analyse des cœurs de chats par la PCR en temps réel, selon le sexe

	N°. de PCR en temps réel positive	Prévalence (%)	IC 95% [a]
Male (n=63)	58	92.1	86-98
Femelle (n=33)	29	87.9	78- 98
Total (n=96)	87	90.6	84-96

[a]Intervalle de confiance à 95%

En ce qui concerne les 63 échantillons de chats mâles, nous constatons que 58 échantillons de cœur (92,1%) sont positifs par qPCR, tandis que chez les 33 chats femelles, 29 échantillons de cœur (87,9%) sont positifs **(tableau 4).**

Statistiquement, aucune différence significative n'est trouvée entre les résultats qPCR obtenus et le sexe du chat (p> 0,05).

Tableau 5: Comparaison de la PCR en temps réel par rapport aux résultats sérologiques du MAT.

	No. de prélèvements avec			
	Cq[a]< 30	Cq≥ 30	Cq=NA[b]	Total
N°. de prélèvements séropositifs (MAT ≥ 6) (%)	21 (95.45%)	25 (38.5%)	2 (22.2%)	48
N°. de prélèvements séronégatifs (MAT < 6) (%)	1 (4.55%)	40 (61.5%)	7 (77.8%)	48
Total	22	65	9	96

[a]cycle de quantification des échantillons de cœur

[b]échantillons de cœur non amplifié

Sur les 96 cœurs testés, 22 (22,9%) présentent un Cq inférieur à 30 ; 65 (67,7%) présentent un Cq supérieur ou égal à 30 et 9 (9,4%) sont négatifs pour la présence d'ADN de *Toxoplasma gondii* **(tableau 5).**

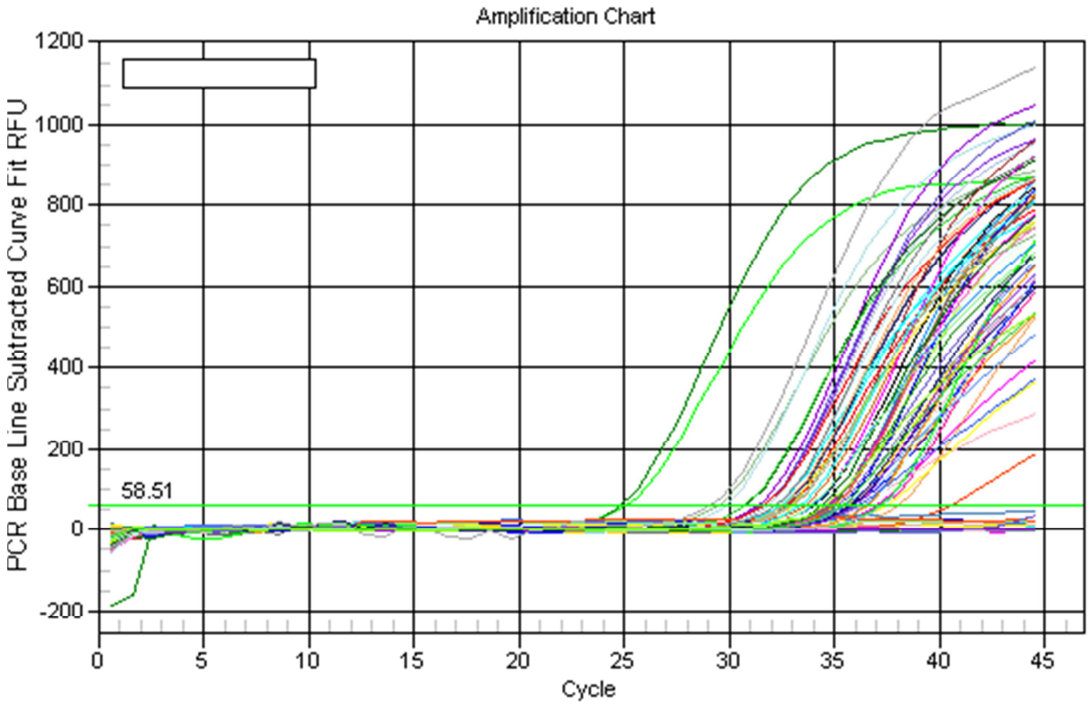


Figure 13 : résultats de qPCR d'organes de chats

Dans le groupe de Cq<30, 21 sur 22 (95,45%) échantillons de sérum sont également positifs (MAT ≥ 6).Alors que, 25 sur 65 échantillons (30,8%) sont séropositifs parmi le groupe d'échantillons ayant un Cq≥ 30. Enfin, dans le groupe d'échantillons négatifs avec le qPCR, 2 sur 9 échantillons de sérum (22,2%) sont de façons inattendues séropositives. Parmi 48 chats séropositifs, 46 cœurs (95,8%), 22 rates (41,7%) et 31 langues (64,5%) s'avèrent positifs par qPCR (voir annexe 5).

2.2.2. Accord entre les tests sérologiques et la détection moléculaire

L'accord général entre les résultats qualitatifs des tests sérologiques (positifs ou négatifs) et les résultats qualitatifs de qPCR (amplification ou non amplification) sont faible, atteignant 55,2%, avec une valeur kappa de Cohen de 0,104 (p = 0,04).
Si l'on considère des échantillons sans amplification avec des échantillons à amplification tardive (Cq> 30) par rapport aux échantillons avec amplification précoce (Cq<30), l'accord général avec les tests sérologiques atteint 70,8% (accord modéré) avec une valeur kappa de Cohen de 0,417 <0,01).

2.2.3. Génotypage

Parmi les 87 échantillons positifs de qPCR, 22 (22,9%) possèdent un Cq<30 et ont été envoyés au Centre National de Référence de la toxoplasmose (Limoges, France) pour les analyses de génotypage.

Au total, nous avons pu amplifier et déterminer le génotype de *T. gondii* de 12 échantillons d'ADN (54,5%) sur au moins 5 marqueurs MS (2 échantillons ont été amplifiés avec succès pour tous les 15 marqueurs MS).

Dix échantillons d'ADN (45,4%) n'ont pas été génotypés: 7 n'ont pas été amplifiés du tout, tandis que 3 ont seulement 1 à 4 marqueurs amplifiés, ce qui rend la méthode peu discriminante et induit un risque élevé de confusion entre les différents types.

Les 12 échantillons d'ADN génotypés sont caractérisés comme étant de type II. L'un d'entre eux a été identifié comme variant de type II (avec un allèle spécifique pour W35) **(tableau 6)**

Tableau 6 : génotypage par les Microsatellites Multilocus des ADNs de *T. gondii* extraits des cœurs de chats errants (*Felis silvestris catus*) à Alger.

N° of DNA isolates from heart samples	**Age**	**Cq of heart samples[a]**	**MS-Type[b]**	***TUB2***	***W35***	***TgM-A***	***B18***	***B17***	**M33**	**MIV.1**	**MXI.1**	***M48***	***M102***	***N60***	***N82***	***AA***	***N61***	***N83***
GT1			I	291	248	209	160	342	169	274	358	209	168	145	119	265	087	306
Me49			II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	091	310
CTG			III	289	242	205	160	336	165	278	356	215	190	147	111	269	089	312
TgA15004			Africa I	291	242	207	160	342	165	278	354	223	166	142	111	277	097	310
DZ-Cat02	5 - 10 y	26.56	II (14/15)	NA	242	207	158	336	169	274	356	211	178	140	109	279	109	310
DZ-Cat07	3 - 5 y	20.84	II (15/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	217	178	142	125	273	115	310
DZ-Cat09	1 - 2 y	28.24	ND(4/15)	NA	244	NA	NA	NA	NA	274	NA	NA	176	140	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat12	3 - 5 y	28.23	II (8/15)	289	242	207	NA	NA	169	NA	356	NA	NA	145	111	NA	085	NA
DZ-Cat43	2 y	28.62	ND (3/15)	NA	NA	NA	NA	NA	169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	267	NA	308
DZ-Cat44	3 y	25.89	II (14/15)	289	242	207	158	336	169	274	NA	219	174	140	111	277	105	308
DZ-Cat52	10-15 y	26.26	II (14/15)	289	242	NA	158	336	169	274	356	219	174	140	111	287	095	308
DZ-Cat59	3 y	28.08	ND (4/15)	289	242	NA	NA	336	NA	NA	NA	NA	NA	140	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat71	1y	26.7	II (6/15)	289	242	NA	NA	336	169	NA	356	NA	NA	NA	119	NA	NA	NA
DZ-Cat72	10-15 y	26.21	II variant W35 (10/15)	289	244	207	158	336	NA	NA	NA	NA	176	140	113	259	NA	310
DZ-Cat78	3 y	25.83	II (13/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	NA	184	140	109	NA	101	310
DZ-Cat84	10-15 y	26.67	II (10/15)	289	NA	207	NA	336	169	274	356	NA	174	140	111	NA	NA	314
DZ-Cat86	3 y	23.29	II (15/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	219	174	140	113	259	105	312
DZ-Cat93	2y	25.69	II (7/15)	289	242	207	158	336	169	274	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat95	3 y	28.61	II (8/15)	289	242	207	NA	NA	169	NA	NA	NA	176	140	109	NA	NA	310

[a]Cycle quantitatif d'échantillons de cœur ; [b]Type de souches génotypées à l'aide de microsatellites multilocus ; ND: souche non déterminée ; NA: séquence non amplifiée ; Y: année

3. Discussion

Le premier objectif de la présente étude est de déterminer la séroprévalence de la toxoplasmose chez une population de chats errants dans la wilaya d'Alger.

Déterminer la séroprévalence de la toxoplasmose chez les chats errants est un moyen d'explorer le risque potentiel d'infection humaine provoquée par ces animaux.

Les taux de prévalence de la toxoplasmose chez le chat est diffèrent d'une région à l'autre dans le monde. En Afrique et en Asie, les taux de séropositivité varient respectivement entre 4,4-95,5% et 40-90% (Al-Kappany et al., 2011; Ayinmode et al., 2016; Haddadzadeh et al., 2006; Sharif et al., 2009; Tiao et al., 2013). En Europe, le taux de séropositivité est supérieur à 30%, variant entre 30,5 et 70,2% dans le nord de l'Italie (Spada et al., 2012), Espagne (Miro et al., 2004), et la Belgique (Dorny et al., 2002).En Amérique centrale et en Amérique du Sud, le taux de séropositivité était de 9,3 à 45,2%, respectivement (Dubey et al., 2009; Pena et al., 2006). Cependant, la comparaison des différentes enquêtes sérologiques chez les félidés semble difficile car la séroprévalence de *T.gondii* varie entre les populations sauvages et domestiques. Aussi cette comparaison est difficile car il existe des facteurs potentiellement confusionnels identifiés comme la méthode sérologique utilisée pour les tests, la taille des échantillons, la localisation géographique et le mode de vie des chats.

Dans la présente étude, la séroprévalence de la toxoplasmose chez des chats errants d'Alger (63 mâles, 33 femelles) est déterminée pour la première fois. En utilisant le test d'agglutination modifié (MAT) avec un seuil à 1: 6, le taux de séropositivité chez les chats errants est de 50%. Le test MAT a été choisi pour sa haute sensibilité et apparait être spécifique pour *T.gondii* , particulièrement pour les populations de chats (Dubey and Thulliez, 1989; Dubey et al., 1995; Dorny et al., 2002; Al-Kappany et al., 2010).

La séroprévalence de la toxoplasmose humaine est estimée en Algérie autour de 50% (Messerer et al., 2014). Ces données confirment un niveau élevé de circulation de *T. gondii* en Algérie pour lequel les chats jouent un rôle important. Par conséquent, les chats peuvent maintenir à un haut degré le risque de toxoplasmose humaine dans cette zone en contaminant l'environnement avec des oocystes. De plus, notre étude a été réalisée chez des chats errants en milieu urbain. Ces animaux errants, en raison de leurs habitudes de chasse, sont plus exposés au risque d'infection comparativement aux chats domestiques normalement nourris de nourriture commerciale et saine (Dorny et al., 2002).

Ces facteurs peuvent expliquer la séroprévalence relativement élevée (50%) observée dans notre étude. De plus ce taux élevé peut être expliqué par les conditions climatiques caractérisées par la chaleur et l'humidité de la région d'Alger et qui sont favorables à la survie des oocystes.

Un total de 31 sur 63 (49,2%) mâles et 17 sur 33 (51,5%) femelles sont positifs à *T.gondii* et aucune différence significative n'est observée entre la prévalence de l'infection et le sexe du chat, suggérant qu'ils ont un même degré de sensibilité à *T.gondii*. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs (Haddadzadeh et al., 2006; Pena et al., 2006; Salant and Spira, 2004) et (Spada et al., 2012).

Néanmoins, certaines études ont révélé une séroprévalence significativement plus élevée chez les mâles errants par rapport aux femelles (Miro et al., 2004). Cette observation peut être expliquée en considérant les habitudes territoriales, car les mâles ont une zone d'opération plus large que les femelles. Au contraire, Besné-Mérida et al. (2008) ont signalé une observation contraire, les femelles étant plus fréquemment infectées que les mâles(Besné-Mérida et al., 2008).

La présente étude montre une augmentation progressive de la prévalence avec l'âge. Cette dernière est plus faible chez les chats de moins d'un an, puis de ceux entre 1-2 ans, suivie des chats âgés de plus de deux ans. Probablement parce que les chats adultes sont plus exposés à *T. gondii* au cours de leur vie. Cette observation est en accord avec ce qui est habituellement rapporté dans la littérature(Afonsoa and Philippe Thulliez, 2006; Haddadzadeh et al., 2006; Pena et al., 2006).

L'étude moléculaire de *T. gondii* réalisée par PCR en temps réel chez les chats montre que la prévalence est de 90,6%, indépendamment du sexe. Cette technique moléculaire semble être plus sensible que la sérologie MAT. L'ADN parasitaire est détecté dans (85%) des échantillons de cœur provenant de chats séronégatifs. Inversement, plus de 95% des échantillons avec Cq<30 (amplifications tardives) sont également séropositifs.

En conséquence, l'accord entre ces deux méthodes augmente lorsque les échantillons négatifs et les amplifications tardives sont regroupés.

Ces résultats suggèrent que dans notre étude, le test MAT ne peut pas déceler les chats infectés avec une faible charge parasitaire. Ce fait encourage l'utilisation d'outils moléculaires lorsque cela est possible, pour améliorer les enquêtes épidémiologiques chez les animaux.

En effet, la PCR a été décrite comme une alternative sensible, spécifique et rapide pour détecter *T.gondii*(Hurtado et al., 2001). Il peut détecter l'ADN des parasites même lorsque les tissus disponibles pour le test sont en état de décomposition (Yai et al., 2003).

En outre, nous avons montré dans cette étude que la PCR en temps réel peut être utilisée pour détecter le parasite dans le cœur, la langue et les échantillons de rate issus des chats errants.
Il est intéressant de noter que dans notre étude, *T.gondii* est détecté plus souvent dans les échantillons de cœur que dans les autres organes chez les chats séropositifs.
On sait peu de choses sur la distribution tissulaire de *T.gondii* chez les chats(Dubey, 2010).
Des études récentes indiquent que *T. gondii* s'enkystent fréquemment dans les tissus extraneuronaux provenant d'animaux infectés naturellement et ou expérimentalement (Al-Kappany et al., 2010). Aussi il a été constaté que la densité de *T.gondii* dans le cœur est plus élevée. Il est également plus facile de retirer le cœur que le cerveau des chats pour les essais biologiques (Al-Kappany et al., 2010).

Le deuxième objectif de la présente étude est de déterminer la diversité génétique des souches de *T. gondii* circulant dans la population de chats d'Alger. C'est le premier communiqué du génotypage de *T. gondii* en Algérie.

Nos résultats ont montré une prédominance de la lignée clonale de type II chez les chats d'Alger. La majorité de nos échantillons correspond exactement au type II (11 échantillons d'ADN) et un est affecté à la variante de type II avec l'allèle spécifique 244 du marqueur W35 (DZ-Cat 72; tableau 6).
Un second échantillon d'ADN (DZ-Cat 09) appartient probablement au même génotype (allèle 244 du marqueur W35) mais le manque de marqueurs amplifiés ne permet pas de conclure. En effet, les marqueurs ne peuvent pas être amplifiés dans de nombreux échantillons d'ADN (12 génotypes incomplets).
Ce manque d'exhaustivité de l'ensemble des données peut s'expliquer par le fait que nous avons travaillé directement sur des échantillons de tissus, nous les avons congelés sans qu'ils n'aient été préalablement isolés par inoculation chez la souris, laquelle pourrait amplifier la quantité de parasites. Cela n'a pas été possible dans notre étude d'isoler le parasite par inoculation chez la souris pour des raisons logistiques (difficulté à stocker des organes à 4° C sur le terrain et absence d'installations de sécurité biologique de niveau 2 pour l'entretien des souris).

Le fait que les deux génotypes complets (15 marqueurs MS amplifiés), correspondent aux deux valeurs de cycle de quantification (Cq) les plus faibles (c'est-à-dire les 2 échantillons dont la concentration d'ADN sont les plus élevées) et que l'on observe une tendance à l'augmentation du nombre de marqueurs amplifiés lorsque les valeurs Cq sont inférieures à 27, soutient ces hypothèses citées en amont (tableau 6).

Nos résultats montrent néanmoins qu'il est toujours possible d'obtenir des données génétiques, même incomplètes, à partir de tissus tels que le cœur avec une logistique relativement simple par rapport à l'isolement des souches chez la souris. Nous devons néanmoins rester prudents sur nos résultats. D'où notre décision de considérer pour le typage, uniquement les échantillons amplifiés avec plus de 5 marqueurs, pour lesquels l'allocation pour un type donné est fiable (ici Type II ou de Type II variant). Pour les échantillons avec moins de 5 marqueurs amplifiés, même s'ils étaient des allèles de Type II, l'alternative des génotypes recombinants ne peut pas être exclue.

Cependant, les données génétiques apportées par notre étude semblent montrer qu'il existe une forte diversité au sein du type II à Alger car aucun clone n'a été observé dans le groupe de 7 souches avec au moins 10 marqueurs amplifiés (au moins un marqueur avec différents allèles).
Il aurait été intéressant de vérifier la diversité géographique des circonscriptions d'Alger pour étudier si cette diversité génétique est liée à la structure spatiale; Cependant ces données n'étaient pas disponibles dans notre étude par manque d'information épidémiologique.

Des études antérieures ont été réalisées sur le génotypage d'isolats de *T.gondii* chez des chats d'autres pays d'Afrique du Nord et d'Afrique de l'Est (Al-Kappany et al., 2010). Al-Kappany et al., ont génotypé *T.gondii* de chats sauvages égyptiens en utilisant 10 marqueurs PCR-RFLP sur 115 isolats. Leur étude révèle une majorité de souches de type II, ce qui est conforme avec nôtre étude. Cent trois isolats appartiennent au type II, 42 au type III et seulement 8 et 4 respectivement aux génotypes atypiques et aux infections mixtes (Al-Kappany et al., 2010).
Dans une autre étude portant sur 33 isolats de chats sauvages éthiopiens, les auteurs ont révélé que neuf de ces isolats correspondent au type II, cinq au type III, dix au type II variant et neuf a toxoDB # 20(Dubey et al., 2013).

De plus, une étude récente sur le génotypage chez des chats errants turcs utilisant l'analyse par MS montre que parmi les 22 isolats, 19 sont identifiés au type II, deux au type III et un au génotype Africa I(Can et al., 2014).

D'autres études ont été menées sur le génotypage de *T.gondii* chez des poulets de l'Afrique subsaharienne et de l'Afrique du Nord. Des études de génotypage Multilocus PCR-RFLP de 19 isolats de poulet de six pays africains ('Égypte, Kenya, Nigeria, Congo, Mali et le Burkina Faso)(Velmurugan et al., 2008), révèlent que 13 de ces isolats sont de type III, cinq ont des allèles de type II à tous les loci sauf apico qui appartient à la lignée de type II et un a un génotype atypique.
Lindstrom et al. (2008) ont trouvé l'ADN de *T. gondii* dans le cerveau de 20 poulets parmi 85 poulets naturellement exposés en Ouganda (Lindström et al., 2008). En utilisant PCR-RFLP avec cinq marqueurs, ils ont montré que six cas sont de type I, huit de type II, 1 de type III et cinq poulets hébergeaient des infections mixtes. Ces résultats révèlent que le type II se retrouve également chez d'autres espèces animales de nombreux pays d'Afrique, comme en Europe(Ajzenberg et al., 2002; Dubey et al., 2008; Dumètre et al., 2006).

Les résultats de la présente étude corroborent les conclusions antérieures selon lesquelles les lignées clonales de type II avec les lignées clonales de type III semblent prédominer chez les animaux domestiques de certaines régions d'Afrique (Lindström et al., 2008; Velmurugan et al., 2008) :l'Algérie, l'Égypte, le Mali, le Kenya et le Congo. Ces observations pourraient être associées à ce que nous avons observé dans la péninsule arabe, où les souches de Type II et III sont également répandues(Al-Kappany et al., 2010; Salant et al., 2009).

De manière assez surprenante, la souche clonale de type III était absente chez nos chats errants en Algérie. Ceci peut être probablement expliqué par la petite taille de l'échantillonnage, ou par d'autres biais non identifiés dans l'échantillonnage. Cependant, nos données montrent des similitudes entre les structures de population de *T. gondii* autour de la Méditerranée. Ces proximités génétiques à travers les différentes régions méditerranéennes pourraient être le résultat d'activités humaines (anthropisation)(Mercier et al., 2011)et les échanges commerciaux privilégiés entre ces pays (Mercier et al., 2010)depuis l'avènement de l'agriculture dans cette région il y a 10 000 ans, associée à la domestication des chats (Vigne et al., 2004).Cette hypothèse est renforcée par des études qui estiment que les lignées clonales II et III émergeaient à cette époque(Boyle et al., 2006; SU et al., 2003).

Cependant, il faut rester prudent sur ces observations en raison du petit nombre d'isolats étudiés, sur un nombre réduit de pays explorés associés à la diversité des marqueurs génétiques utilisés à travers les études et le génotypage parfois incomplet, rendant la comparaison incertaine. De plus, des génotypes non classiques du parasite associés à une plus grande diversité génétique ont été décrits dans d'autres pays d'Afrique occidentale et centrale à partir de souches animales et humaines (Ajzenberg et al., 2009, 2004; Mercier et al., 2010) . Dans ces études, après un génotypage multilocus utilisant des marqueurs MS, un seul de ces isolats est de type II, 41 de type III et 44 ont un génotype mixte impliquant des allèles de type I et / ou de type II et / ou de type III (Africa 1, 2 et 3), habituellement avec une majorité d'allèles de type I (Ajzenberg et al., 2009, 2004; Mercier et al., 2010). La plus grande proportion de génotypes non archétypiques diffère des études africaines précédentes.

La diversité génétique réduite pour au moins l'Afrique du Nord, est en contraste avec *T. gondii* d'Amérique du Sud, où les populations de parasites sont très diverses (Lehmann et al., 2006; Pena et al., 2008). Ceci est notamment illustré par la plupart des isolats de chats du Brésil ou de Guyane qui sont virulents chez la souris (Dubey et al., 2004; Mercier et al., 2011; Pena et al., 2008). Parmi les 46 souches génotypées de *T. gondii* provenant de chats de Sao Paulo (Brésil), 20 sont sans génotypes clonaux de types I, II ou III (Dubey et al., 2004; Pena et al., 2008). En Guyane, deux souches de génotypes atypiques ont été isolées chez des chats errants de la ville de Cayenne provoquant la mort des souris avant 20 jours après l'inoculation(Mercier et al., 2011).

Sur la base de nos résultats, nous pouvons conclure que le génotype II de *T.gondii* est prédominant chez les chats d'Alger. Cependant, l'absence de type III dans notre étude et la description récente d'une plus grande diversité génétique de *Toxoplasma* dans certaines régions d'Afrique (Ajzenberg et al., 2009, 2004; Mercier et al., 2010) doit promouvoir de nouvelles explorations de la diversité génétique de *T. gondii*.

La diversité génétique en Afrique est importante pour élucider l'histoire évolutive de *T. gondii* et surtout pour comprendre la variété des formes cliniques. Plusieurs études ont plaidé pour un rôle des génotypes dans l'expression clinique de la toxoplasmose(Carme et al., 2002; Dardé, 2008; De Salvador-Guillouët et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Gallego et al., 2006; Mercier et al., 2010) et dans le cas de l'Afrique, certaines caractéristiques de la pathogénicité de la toxoplasmose humaine semblent émerger (Gilbert et al., 1999; Ronday et al., 1996).

Par conséquent, d'autres études épidémiologiques moléculaires plus larges sont nécessaires pour isoler éventuellement d’autres génotypes dans d'autres régions d 'Algérie, et plus largement à travers le continent africain.

1. Matériels et méthodes

1.1. Éthique

Dans le cadre du Programme national de lutte contre la rage, Hygiène Urbaine d'Alger (HURBAL) est chargée de capturer des chats errants et des chiens de la région d'Alger.

Ce programme est réalisé par HURBAL, institution fiduciaire du Ministère algérien de l'Intérieur, de l'Administration Locale et du Ministère Algérien de l'Agriculture et du Développement Rural. Deux autres vétérinaires sont chargés d'assurer la bonne santé des animaux capturés. Les chats sont pris avec précaution avec pince à gaine. Une fois capturés, les animaux sont logés dans des cages régulièrement nettoyées et désinfectées. Ils sont euthanasiés seulement après l'expiration du délai légal de garde (les propriétaires ont sept jours pour réclamer leurs animaux).

1.2. Lieu d'étude et échantillonnage

Nous avons récolté des échantillons de sang et d'organes (cœur, rate et langue) provenant de 96 chats errants (63 mâles et 33 femelles) vivant dans la wilaya d'Alger. Ces échantillons ont été prélevés pendant les mois de juillet et août 2015.

Les prélèvements sont réalisés au niveau de la fourrière canine de la wilaya d'Alger, .(latitude 36° 42′00″ N, longitude 3° 13′ 00″ E). qui ne dispose que d'une seule fourrière canine située dans la commune d'El-Harrach et dépendant du bureau d'hygiène communal de la ville d'Alger (HURBAL). Elle est en activité depuis plus d'un siècle et ayant en charge la lutte contre les zoonoses qui présentent un problème de santé publique.
La fourrière a pour rôle de :

- Capturer et de prendre en charge les animaux dangereux ou errants ;
- Mettre en observation les animaux suspects de maladies contagieuses telle que la rage ;
- Euthanasier ces animaux en cas de maladies incurables ou sénilité ;
- Restituer les animaux capturés réclamés par leurs propriétaires ;
- Abattre et enfouir les animaux morts après chaulage.

Pour capturer les chiens et les chats errants, les agents interviennent dans les voies publiques au niveau de 57 communes de la wilaya d'Alger en collaboration avec les bureaux

communaux d'hygiène, les collectivités (hôpitaux, hôtels, cités universitaires, sociétés privées et étatiques), et au domicile des citoyens(Benjaballah, 2006).

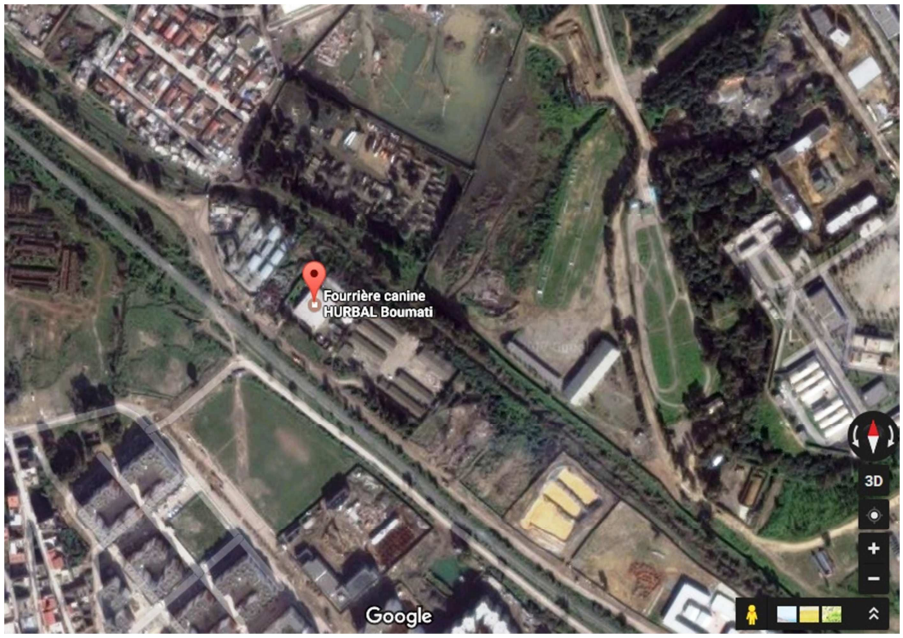


Figure 8 : Fourrière canine d'Alger (source : Googleearth)

L'échantillonnage est effectué dans une salle dédiée aux activités vétérinaires.
Des échantillons d'organes sont prélevés immédiatement après l'euthanasie des animaux.
L'âge approximatif de chaque chat est estimé sur la base de la dentition. Les chats sont classés comme juvéniles (<1 an), sous-adultes (1 an-2 ans) et adultes (> 2 ans) (García-Bocanegra et al., 2010). Le sexe est également enregistré pour chaque animal.
Les sérums sont séparés du caillot sanguin par centrifugation pendant 10 min à 1900 g et stockés avec des échantillons de cœur, de rate et de langue à -20 ° C jusqu'à l'analyse.

Ensuite tous les échantillons ont été envoyés avec de la carboglace pour être traités dans les centres nationaux français de référence de la toxoplasmose :

- Reims pour les examens sérologiques et l'extraction d'ADN.
- Limoges pour les analyses de génotypage.

1.3. Examen sérologique

La recherche des anticorps spécifiques, simple à réaliser peut apporter un diagnostic de certitude en raison de la spécificité des différentes techniques. De plus, elle permet l'étude des différents types d'anticorps (IgG, IgM, IgA, IgE). Une bonne connaissance de la cinétique d'évolution de ces anticorps est nécessaire pour interpréter correctement une sérologie de la toxoplasmose.

-Les anticorps IgM sont détectables environ une semaine après l'infection, elles vont augmenter pour atteindre leur maximum en 2 à 3 semaines, puis diminuer plus lentement, pour disparaitre en général en 5 à 6 mois, mais peuvent persister plusieurs mois voire plus d'une année, avec des techniques très sensibles.

-Les IgG spécifiques sont détectées environ une semaine après les IgM, elles vont augmenter rapidement, pour atteindre un taux maximal en deux mois, qui restent en plateau à un taux élevé pendant plusieurs mois puis s'abaissent lentement et persistent à un taux faible, témoin d'une infection toxoplasmique ancienne.

Ainsi, la détection des anticorps IgM seuls est insuffisante pour l'établissement d'une infection aiguë. Le dosage respectif des IgM et des IgG spécifiques est nécessaire pour dater l'infection.

-Les anticorps IgA sont considérés comme un marqueur de l'infection aiguë, qui sont produits plus tôt que les IgM, et peuvent persister pendant plusieurs mois, elles ne sont pas recherchées systématiquement, mais peuvent être d'une grande aide pour la confirmation d'une séroconversion toxoplasmique récente ou d'une réactivation sérologique (Liu et al., 2015)

Pour la mise en évidence ou le dosage de ces différentes classes d'immunoglobulines de nombreuses techniques sérologiques peuvent être utilisées. Nous avons opté pour le test d'agglutination modifié (MAT) ou connu aussi sous le nom d'agglutination direct haute sensibilité (ADHS)

Test d'agglutination modifié (MAT)

Les échantillons de sérum sont décongelés et testés pour la présence d'anticorps IgG spécifiques de *T. gondii* avec le test d'agglutination modifié (MAT) (Dubey and Desmonts, 1987). Les sérums de chats sont testés en utilisant des dilutions allant de 1: 6 à 1: 12800.

La dilution 1: 6 a été choisie comme limite de positivité. Pour le test MAT, des tachyzoïtes de *T. gondii* fixés au formol sont ajoutés à des plaques de microtitrage en forme de U et des sérums à tester dilués sont ensuite ajoutés(Desmonts and Remington, 1980). Ce test a d'abord été décrit par Fulton et Turk, avec une spécificité et une sensibilité faibles, en raison de la liaison des IgM normales à la surface du parasite et amélioré en préparant l'antigène en utilisant un tampon contenant du 2 mercaptoéthanol pour éliminer les IgM non spécifiques. Ce test détecte les anticorps IgG, chez n'importe quelle espèce hôte, et peut être utilisé sur les sérums hémolysés. Cependant des résultats faux négatifs peuvent se produire au cours des premiers stades de l'infection aiguë(Zhu et al., 2012)(Liu et al., 2015).Le test MAT est simple et précis, il est commode à la fois pour le diagnostic de laboratoire et pour les enquêtes épidémiologiques (Liu et al., 2015).

Principe du test MAT

-Mettre à température ambiante les différents réactifs à utiliser :

-PBS PH 7.2 Biomerieux

-BABS Biomerieux

-Antigène figuré (tachyzoïte entier formolé à partir de la souche I (RH))

-Solution mère de dithiothréitol 1M (7.725 g de DTT+ 0.04 g d'acétate de sodium qsp 50 ml avec de l'eau Mili Q puis filtrer sur 0.45 µ et congeler sous 1ml)

-Préparer la dilution d'antigène figuré au 1/17 extemporanément en tampon BABS Biomerieux (si flacon d'antigène neuf, agiter le flacon, ajouter 5µl de formol dans 10 ml d'antigène et réagiter. Ce flacon ainsi formolé sera gardé à 4°C jusqu'à l'utilisation complète du flacon)

-Dilution des sérums en PBS PH 7,2 Biomerieux au 1/3 (25µl de sérum+ 50µl de PBS)

-préparation du dithiothréitol (solution mère) au 1/50 en PBS PH 7.2

Mode opératoire

-Déposer 25µl de dilution de sérum au 1/ 3 dans la première cupule de la plaque

-Distribuer 25µl de dithiothréitol (DTT) dilué au 1/50 dans toute la ligne de la plaque

-Faire une dilution sériée de ½ en ½ sur toute la ligne

-Distribuer 25µl d'antigène dilué au 1/17 sur toute la ligne

-Homogénéiser la plaque

-La recouvrir d'un film adhésif pour éviter l'évaporation

-Incuber toute la nuit à température ambiante à l'abri des vibrations

-Lecture le lendemain

-Le résultat sera rendu en dilution, soit respectivement le premier puits=1/6, deuxième=1 /12 …etc.

-Un résultat est considéré positif lorsque il y'a un voile d'agglutination sur toute la cupule ou si le voile d'agglutination couvre la moitié ou plus la cupule (≥50 %).

-Un résultat est considéré négatif lorsqu'il y a un voile de sédimentation des tachyzoïtes ou si il y'a un voile d'agglutination inférieur à (<50 %) de la cupule. Les résultats trouvés pour chaque prélèvement sont mentionnés sur le tableau du MAT (voir annexe 1)

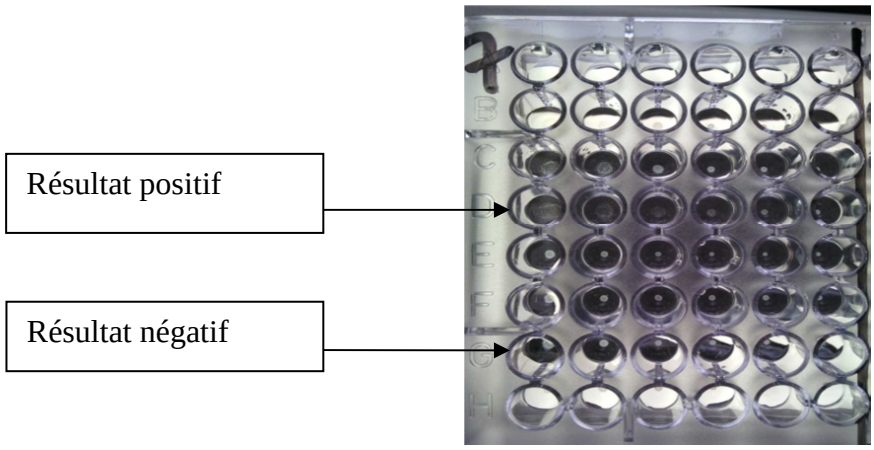


Figure 9 : Résultats sérologiques d'agglutination des prélèvements sur plaque avec le test MAT (photo personnelle).

1.4. Méthodes moléculaires

1.4.1. Extraction d'ADN

Après décongélation, nous avons analysé le cœur entier de chaque chat, et nous avons étudié aussi la rate et la langue uniquement chez les chats dont la sérologie est positive.

Pour l'analyse, les organes sont traités avec de la trypsine avec le protocole suivant :

- Peser les organes et préparer la solution de trypsine (T4674 SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, France) dilué au1/10 (20 ml trypsine et 180 ml d'eau physiologique) (200g d'organe pour 300ml de trypsine)

-Déposer séparément les organes dans le bol du mixeur et les broyer pendant environ 2mn

-Prendre la totalité du broyat et le mettre dans un erlenmeyer, ajouter 20 ml de solution de trypsine diluée (concentration finale 0,25%).et un barreau aimanté,

-Bien homogénéiser et boucher l'erlenmeyer, avec du papier d'aluminium

-Mettre sous agitation à l'étuve pendant 90 minutes à 37 ° C

-Une fois le traitement à la trysine terminé, filtré la totalité dans un autre erlenmeyer, à l'aide d'un entonnoir et de 2 épaisseurs de gaze

-Bien presser la gaze à la main pour récupérer le maximum de filtrat

-Mettre le filtrat dans un tube de 50 ml en plastique

-Centrifuger 10 min à 1900 g

-Retirer le surnageant

-Faire deux lavages en eau physiologique (10min à 1900 g)

-Récupérer les culots dans un tube de 15 ml en rinçant les tubes de 50ml et centrifuger 10min à 1900 g (troisième lavage)

-Ecarter 300 µl d'homogénat dans un tube conique pour PCR, et les conserver à -80 ° C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

L'extraction de l'ADN est effectuée avec le kit EZ1 DNA tissus (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fabricant. Comme recommandé:

-Décongélation des tubes contenant 300 µl d'homogénat à température ambiante

-Ajouter 1ml de tampon Tris EDTA à [x1] (lavage en tampon) sous une hotte poste de sécurité microbiologique pour éviter les contaminations

-Bien homogénéiser la solution et centrifuger à 18090 g pendant 5 min.

-Après centrifugation enlever le surnageant et ajouter au culot10 µl de solution de protéinase K et 190 µl de tampon G2

-Bien homogénéiser la solution de 200 µl et la mettre à incuber dans un bloc chauffant (bain sec) à 56 ° C pendant 90 minutes ou plus jusqu'à la lyse complète.

-200µl d'échantillon lysé sont transférés dans un nouveau tube d'ADN de 2 ml.

Les étapes d'extraction et de purification sont effectuées par l'extracteur automatisé d'ADN BioRobot EZ1 (Qiagen). Les étapes d'extraction d'ADN comprennent :

-La lyse de l'échantillon

-La liaison de l'acide nucléique de l'échantillon à des particules magnétiques

- Enfin, le lavage et l'élution de100 µl d'acides nucléiques (ADN), et la conservation à -80 ° C jusqu'à utilisation ultérieure

Le kit DNA EZ1 tissus (voir annexe 2) est destiné à la purification d'ADN génomique à partir de tissus et d'autres échantillons. La technologie des particules magnétiques fournit un ADN

de haute qualité adapté à une utilisation directe dans les applications en aval telles que l'amplification ou d'autres réactions enzymatiques.

L'instrument EZ1 effectue toutes les étapes de la procédure de préparation de l'échantillon, et la procédure peut être augmentée ou réduite, ce qui permet une purification à partir de quantités variables de matière de départ **(**voir annexe 3)

Figure 10 : Extracteur automatisé d'ADN BioRobot EZ1 (Qiagen) (photo personnelle)

1.4.2. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les ADN extraits des échantillons de cœur, de rate et de langue sont testés par PCR quantitative en temps réel avec une sonde marquée sur un thermocycleur (Bio-Rad iQ5) (Foster, Californie, Etats-Unis) ciblant l'élément répétitif AF146527 de 529 pb de *T. gondii*(De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012).

Les amorces de séquence sens et anti-sens sont 5'-CGGAGAGGGAGAAGATGTT-3 'et 5'-GCCATCACCACGAGGAAA-3', respectivement. La sonde utilisée est 5'-FAM-CTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGG-BHQ1-3 '(De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012).

Mode opératoire (qPCR)

-Décongeler les échantillons contenant l'extraction d'ADN (tube à vis de 100 µl)

-Décongeler les réactifs pour PCR : amorce sens et anti-sens, sonde, platinum UDG (Platinum supermix UDG®, Invitrogen, Paisley, UK) qui contient : tampon, dATP, dCTP, dGTP, dUTP-MgCl2-Taq polymérase.

-Préparer un volume total de chaque réactif de PCR (ADN et le mix), de sorte que Chaque réaction de PCR contient 10 µl d'ADN extrait, mélangé à 15 µl d'un mélange PCR (PCR mix) contenant 12,5 µl de platinum UDG (Platinumsupermix UDG®, Invitrogen, Paisley, UK), à une concentration de 3 mM MgCl2, 0,5 µl de chaque amorce à une concentration de 20 µM, 0,5 µl de sonde marquée à une concentration de 2 µM.

-Placer la plaque de PCR à 96 puits et à l'aide d'une micropipette, remplir les puits avec un volume de 15 µl mix.

-Ajouter de l'eau au puits consacré pour le témoin négatif

- Ajouter dans chaque puits10 µl d'ADN extrait

-Ajouter de l'ADN extrait des tachyzoïtes cultivés (souche RH) au puits consacré pour le témoin positif

-Refermer les puits avec un film pour empêcher l'évaporation.

- Déposer cette plaque dans le thermocycleur (Bio-Rad iQ5) (Foster city, California, USA) et faire correspondre toutes les données du plan de la plaque de PCR au logiciel.

-Programmation du cycle de température :

- étape 1 : décontamination initiale par UDG à 50 °C pendant 2 min pour empêcher l'amplification des produits de PCR contaminants et dénaturation à 95 ° C pendant 2 min pour inactiver l'UDG
- étape 2 : dénaturation pour chaque cycle (45cycles) à 95 ° C pendant 15 s
- étape 3 : hybridation/ élongation à 60 ° C pendant 1 min.
- Les résultats sont analysés avec le logiciel iCycler.

Figure 11: Thermocycleur (Bio-Rad iQ5) (photo personnelle).

Principe de (qPCR)

La PCR quantitative en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique, excepté qu'elle nécessite l'utilisation d'une sonde en plus des deux amorces. Il existe différents systèmes de détection quantitative des amplicons (SYBR Green, Hydrolyse de sondes TaqMan assay, Hybridation de 2 sondes, Balises moléculaires). Nous avons analysé nos échantillons avec la PCR quantitative en temps réel avec utilisation d'une sonde TaqMan.

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfert son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence résonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence(Mackay et al., 2002).

Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise.

Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives.

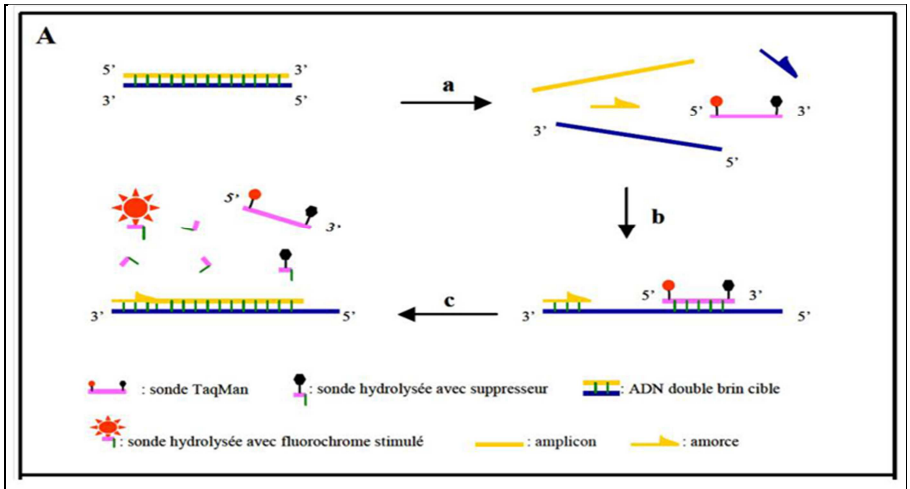
A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement

du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde(Poitras and Houde, 2002).

L'émission de fluorescence enregistrée à la fin de chaque cycle de PCR permet de définir une valeur de Ct (cycle threshold ou cycle seuil) correspondant au nombre de cycles de PCR à partir duquel la valeur de l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond. La valeur du Ct est d'autant plus faible que le nombre initial de copies de la séquence cible est grand(Higuchi et al., 1993).

L'utilisation d'une sonde TaqMan en plus des deux amorces augmente fortement la spécificité des amplicons générés.

Les avantages de la PCR quantitative en temps réel sont sa rapidité de mise en œuvre et un risque nul de contamination post-PCR du fait que les tubes ne sont pas ouverts après amplification. Les risques de contamination pré-PCR par de l'ADN étranger lors des étapes d'extraction et de purification de l'ADN et/ou de préparation des réactions de PCR sont cependant les mêmes que pour la PCR conventionnelle. En revanche, la PCR quantitative en temps réel est très sensible à la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase (tel que polysaccharides, protéines, solvants organiques.), ce qui nécessite de veiller à la pureté des ADN extraits.



Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: TaqMan® assay)
(**a**) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.
(**b**) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute.
(**c**) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Schéma extrait de l'article de Elyse Poitras et Alain Houde dans Reviews In Biology and Biotechnology Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11

Figure 12 : schéma des principales étapes de la qPCR avec utilisation d'une sonde TaqMan

1.4.3. Analyse génotypique

L'ADN de *T. gondii* des échantillons de cœurs ayant une valeur de cycle de quantification (Cq) <30 par qPCR a été soumise à une analyse de génotypage à l'aide de 15 marqueurs de microsatellites (TUB2, W35,TgM-A, B18, B17, M33, IV.1, XI, M48, M102, N60, N82, AA, N61 et N83) dans un test de PCR multiplex décrit précédemment par Ajzenberg(Ajzenberg et al., 2010).

Au cours de l'analyse, en plus de nos nouveaux échantillons d'ADN, plusieurs souches de référence sont analysées en parallèle, les souches de référence pour :

-le Type I (TgA00004 = GT1),

-le Type II (Me49)

-le Type III (CTG)

- et une autre souche de référence originaire d'Afrique [Souche Africa 1 (TgA15004 = GAB2-2007-GAL-DOM2)] (Dubey, 1992; Lunde and Jacobs, 1983; Mercier et al., 2010; Pfefferkorn et al., 1977; Su et al., 2012).

En bref, dans chaque paire d'amorces, l'amorce sens est marquée à l'extrémité 5 'avec de la fluorescéine pour permettre l'encollage des produits de PCR soumis à une électrophorèse dans un séquenceur automatique.

La PCR est réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µl consistant en 12,5 µl de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, France), 5 pmol de chaque amorce et 5 µl d'ADN. Les conditions cycliques sont:

-15 min à 95ºC (dénaturation initiale);

-30 s à 94ºC, 3 min à 61ºC et 30 s à 72ºC (35 cycles);

- et 30 min à 60 ° C (élongation finale).

Un µl de chaque produit de PCR est mélangé directement avec 0,5 µl d'un étalon de taille marqué par un colorant (ROX 500, Applied Biosystems) et 23,5 µl de formamide désionisé.

Ce mélange est dénaturé à 95 ° C pendant 5 min puis soumis à une électrophorèse en utilisant un séquenceur automatique (ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems).

Les tailles des allèles en paires de bases (pb) sont estimées à l'aide du logiciel d'analyse Gene Mapper (version 4.0, Applied Biosystems).

Principe des microsatellites

Les séquences de microsatellites (MS) sont des répétitions en tandem de motifs d'ADN courts (1 à 6 pb) qui sont omniprésents dans les génomes eucaryotes et subissent des changements de longueur en raison de l'insertion ou de la suppression d'une ou plusieurs unités répétées.

Le mécanisme de mutation le plus couramment proposé pour les séquences de MS est le glissement des brins, qui se produit principalement pendant la réplication. Les nombres de motifs répétés diffèrent dans une population, créant ainsi des allèles multiples à un locus MS. Les répétitions en tandem dans *T. gondii* sont souvent simples, et composées avec aussi peu que 2 nucléotides, et se produisent 2-20 fois.

Ajzenberg et al. Ont mis au point une méthode facile à utiliser pour le génotypage de *T. gondii* dans un seul test PCR multiplex utilisant 15 marqueurs microsatellites.

Les loci MS sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces sens marquées par fluorescence et d'amorces anti-sens non marquées. Les produits marqués par colorant sont séparés par taille en utilisant une électrophorèse automatisée et identifiés par détection de fluorescence.

Le résultat du génotypage avec 15 marqueurs microsatellites montre que les 8 marqueurs MS (TUB2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1 et XI.1) pourraient différencier les types I, II et III de tous les génotypes atypiques et les 7 autres marqueurs (M48, M102, N60, N82, AA, N61 et N83) pourraient améliorer la résolution génétique en différenciant les isolats au sein d'un haplogroupe ou d'une lignée clonale (Ajzenberg et al., 2010).

Cette technique est une méthode de génotypage rapide et facile à utiliser qui vise à assurer à la fois les niveaux de discrimination génétique des isolats de *T. gondii* dans un seul test de PCR multiplex en utilisant 15 marqueurs MS situés sur 11 chromosomes différents de *T. gondii* (Ajzenberg et al., 2010).

Tableau 1 : Marqueurs microsatellites et amorces PCR utilisés pour le test de PCR multiplex(Ajzenberg et al., 2010).

Marker	Chromosome (position)[a]	Repeat motif(s)	Primer sequence[b]	Size range (bp)
TUB2	IX (974608 to 974896)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-GTCCGGGTGTTCCTACAAAA 3′ (R) 5′ TTGGCCAAAGACGAAGTTGT 3′	287–291
W35	II (633241 to 633482)	[TC/AG]$_n$, [TG/AC]$_n$	(F) 5′ HEX-GGTTCACTGGATCTTCTCCAA 3′ (R) 5′ AATGAACGTCGCTTGTTTCC 3′	242–248
TgM-A	X (4824879 to 4825083)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ HEX-GGCGTCGACATGAGTTTCTC 3′ (R) 5′ TGGGCATGTAAATGTAGAGATG 3′	203–211
B18	VIIa (2921536 to 2921693)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-TGGTCTTCACCCTTTCATCC 3′ (R) 5′ AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA 3′	156–170
B17	XII (6474746 to 6475079)	[TC/AG]$_n$	(F) 5′ HEX-AACAGACACCCGATGCCTAC 3′ (R) 5′ GGCAACAGGAGGTAGAGGAG 3′	334–366
M33	IV (672591 to 672760)	[TC/AG]$_n$	(F) 5′ 6-FAM- TACGCTTCGCATTGTACCAG 3′ (R) 5′ TCTTTTCTCCCCTTCGCTCT 3′	165–173
IV.1	IV (742419 to 742693)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ HEX-GAAGTTCGGCCTGTTCCTC 3′ (R) 5′ TCTGCCTGGAAAAGGAAAGA 3′	272–282
XI.1	XI (189702 to 190058)	[TG/AC]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-GCGTGTGACGAGTTCTGAAA 3′ (R) 5′ AAGTCCCCTGAAAAGCCAAT 3′	354–362
M48	Ia (332951 to 333166)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-AACATGTCGCGTAAGATTCG 3′ (R) 5′ CTCTTCACTGAGCGCCTTTC 3′	209–243
M102	VIIa (3093491 to 3093664)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ NED-CAGTCCAGGCATACCTCACC 3′ (R) 5′ CAATCCCAAAATCCCAAACC 3′	164–196
N60	Ib (1766079 to 1766221)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ NED-GAATCGTCGAGGTGCTATCC 3′ (R) 5′ AACGGTTGACCTGTGGCGAGT 3′	132–157
N82	XII (1621472 to 1621585)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ HEX-TGCGTGCTTGTCAGAGTTC 3′ (R) 5′ GCGTCCTTGACATGCACAT 3′	105–145
AA	VIII (5836880 to 5837144)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ NED-GATGTCCGGTCAATTTTGCT 3′ (R) 5′ GACGGGAAGGACAGAAACAC 3′	251–332
N61	VIIb (4217145 to 4217238)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-ATCGGCGGTGGTTGTAGAT 3′ (R) 5′ CCTGATGTTGATGTAAGGATGC 3′	79–123
N83	X (1772898 to 1773209)	[TA/AT]$_n$	(F) 5′ 6-FAM-ATGGGTGAACAGCGTAGACA 3′ (R) 5′ GCAGGACGAAGAGGATGAGA 3′	306–338

[a]Basé sur la position dans chaque chromosome de la souche ME49 comme indiqué sur le site Web Toxo DB (http://toxodb.org).

[b](F), amorce sens; (R), amorce anti-sens. Dans chaque paire d'amorces, l'amorce sens est marquée à la fin 5 'avec de la flurorescéine: 6-carboxyfluorescéine (6-FAM) pour MS TUB2, XI.1, B18, N83, N61, M33 et M48, l'hexachlorofluorescéine (HEX) Pour MS TgM-A, B17, N82, W35 et IV.1, et 2, 7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein (NED) pour MS AA, N60 et M102.

1.5. Analyses statistiques

L'analyse statistique est réalisée à l'aide de SPSS Statistics 19.0. La signification statistique entre la séroprévalence et l'âge ou le sexe est évaluée par le test $\chi 2$.

Ces analyses sont considérées comme significatives lorsque p <0,05. Les intervalles de confiance (95%) sont calculés selon la méthode décrite par Toma (Toma et al., 1996).
L'accord entre les résultats qualitatifs obtenus à partir des tests sérologiques et qPCR est évalué en calculant le kappa de Cohen. L'accord avec des valeurs kappa de 0,00 à 0,20 est considéré comme léger, 0,21 à 0,40 juste, 0,41 à 0,60 modéré, 0,61 à 0,80 significatif et 0,81 à 1,00 presque parfait (Landis and Koch, 1977).

2. Résultats

2.1. Tests sérologiques

Les échantillons de sérums (n = 96) ont été testés pour la présence d'IgG spécifiques de *T. gondii* avec le test d'agglutination modifié (MAT), en utilisant 1: 6 comme seuil de positivité.

Tableau 2: Séroprévalence de *T. gondii* chez les chats errants

N°. Chats testés	N°. Chats séropo-sitifs	Nombre de sérums avec un titre MAT de :											
		6	10	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
96	48 (50%)	3 (3.1%)	4 (4.1%)	3 (3.1%)	2 (2.1%)	3 (3.1%)	2 (2.1%)	6 (6.2%)	2 (2.1%)	6 (6.2%)	7 (7.3%)	8 (8.3%)	2 (2.1%)

Nous avons trouvé des anticorps contre *T. gondii* chez 48 des 96 chats (50%) (CI = 40% - 60%), avec des titres entre 6 et 12800. La majorité des titres sont élevés entre 400 et 6400 **(tableau 2)** (plus de détails dans annexe 4).
Nous avons trouvé aussi des anticorps contre *T.gondii* chez 31 parmi 63 (49,2%) mâles et 17 parmi 33 (51,5%) femelles. Aucune différence statistiquement significative n'est observée entre la prévalence de l'infection et le sexe du chat (p> 0,05)

Tableau 3: Séroprévalence de *T. gondii* selon le sexe et l'âge des chats errants

catégorie	Chats examinés	Chats séropositifs	P (χ^2)	IC 95%[a]
Sexe				
Femelle	33	17 (51.5%)	0.8	36-66
Male	63	31 (49.2%)		38-60
Age (année)				
<1 (juvéniles)	25	2 (8.0%)		1-15
1-2 (sub-adultes)	40	25 (62.5%)	<0.005	49-75
>2 (adultes)	31	21 (67.7%)		52-82

[a]Intervalle de confiance à95%

Nous constatons la présence des anticorps contre *T.gondii* chez 2 parmi 25 (8%) chats juvéniles (<1 an), 25 parmi 40 (62,5%) chats sub-adultes (1 an-2 ans) et 21 parmi 31

(67,7 %) chats Adultes (> 2 ans). Les différences entre les catégories d'âge sont significatives (P <0,005) **(tableau 3).**

2.2. Détection et identification moléculaires

2.2.1. qPCR

Globalement, 87 des 96 cœurs (90,6%) recueillis et testés par qPCR s'avèrent positifs pour *T.gondii*, avec des valeurs de cycle de quantification (Cq) allant de 20,8 à 39,0 (voir annexe 5)

Tableau 4: Résultats d'analyse des cœurs de chats par la PCR en temps réel, selon le sexe

	N°. de PCR en temps réel positive	Prévalence (%)	IC 95% [a]
Male (n=63)	58	92.1	86-98
Femelle (n=33)	29	87.9	78- 98
Total (n=96)	87	90.6	84-96

[a]Intervalle de confiance à 95%

En ce qui concerne les 63 échantillons de chats mâles, nous constatons que 58 échantillons de cœur (92,1%) sont positifs par qPCR, tandis que chez les 33 chats femelles, 29 échantillons de cœur (87,9%) sont positifs **(tableau 4).**

Statistiquement, aucune différence significative n'est trouvée entre les résultats qPCR obtenus et le sexe du chat (p> 0,05).

Tableau 5: Comparaison de la PCR en temps réel par rapport aux résultats sérologiques du MAT.

	No. de prélèvements avec			
	Cq[a]< 30	Cq≥ 30	Cq=NA[b]	Total
N°. de prélèvements séropositifs (MAT ≥ 6) (%)	21 (95.45%)	25 (38.5%)	2 (22.2%)	48
N°. de prélèvements séronégatifs (MAT < 6) (%)	1 (4.55%)	40 (61.5%)	7 (77.8%)	48
Total	22	65	9	96

[a]cycle de quantification des échantillons de cœur

[b]échantillons de cœur non amplifié

Sur les 96 cœurs testés, 22 (22,9%) présentent un Cq inférieur à 30 ; 65 (67,7%) présentent un Cq supérieur ou égal à 30 et 9 (9,4%) sont négatifs pour la présence d'ADN de *Toxoplasma gondii* **(tableau 5).**

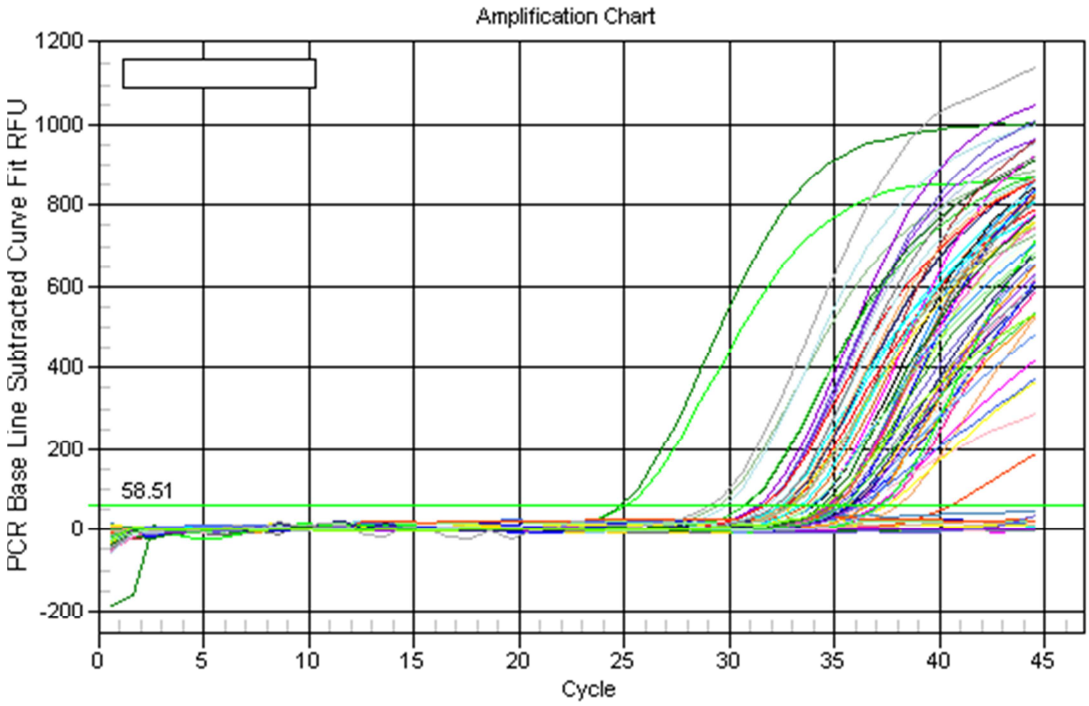


Figure 13 : résultats de qPCR d'organes de chats

Dans le groupe de Cq<30, 21 sur 22 (95,45%) échantillons de sérum sont également positifs (MAT ≥ 6).Alors que, 25 sur 65 échantillons (30,8%) sont séropositifs parmi le groupe d'échantillons ayant un Cq≥ 30. Enfin, dans le groupe d'échantillons négatifs avec le qPCR, 2 sur 9 échantillons de sérum (22,2%) sont de façons inattendues séropositives. Parmi 48 chats séropositifs, 46 cœurs (95,8%), 22 rates (41,7%) et 31 langues (64,5%) s'avèrent positifs par qPCR (voir annexe 5).

2.2.2. Accord entre les tests sérologiques et la détection moléculaire

L'accord général entre les résultats qualitatifs des tests sérologiques (positifs ou négatifs) et les résultats qualitatifs de qPCR (amplification ou non amplification) sont faible, atteignant 55,2%, avec une valeur kappa de Cohen de 0,104 (p = 0,04).
Si l'on considère des échantillons sans amplification avec des échantillons à amplification tardive (Cq> 30) par rapport aux échantillons avec amplification précoce (Cq<30), l'accord général avec les tests sérologiques atteint 70,8% (accord modéré) avec une valeur kappa de Cohen de 0,417 <0,01).

2.2.3. Génotypage

Parmi les 87 échantillons positifs de qPCR, 22 (22,9%) possèdent un Cq<30 et ont été envoyés au Centre National de Référence de la toxoplasmose (Limoges, France) pour les analyses de génotypage.

Au total, nous avons pu amplifier et déterminer le génotype de *T. gondii* de 12 échantillons d'ADN (54,5%) sur au moins 5 marqueurs MS (2 échantillons ont été amplifiés avec succès pour tous les 15 marqueurs MS).

Dix échantillons d'ADN (45,4%) n'ont pas été génotypés: 7 n'ont pas été amplifiés du tout, tandis que 3 ont seulement 1 à 4 marqueurs amplifiés, ce qui rend la méthode peu discriminante et induit un risque élevé de confusion entre les différents types.

Les 12 échantillons d'ADN génotypés sont caractérisés comme étant de type II. L'un d'entre eux a été identifié comme variant de type II (avec un allèle spécifique pour W35) **(tableau 6)**

Tableau 6 : génotypage par les Microsatellites Multilocus des ADNs de *T. gondii* extraits des cœurs de chats errants (*Felis silvestris catus*) à Alger.

N° of DNA isolates from heart samples	**Age**	**Cq of heart samples[a]**	**MS-Type[b]**	***TUB2***	***W35***	***TgM-A***	***B18***	***B17***	**M33**	**MIV.1**	**MXI.1**	***M48***	***M102***	***N60***	***N82***	***AA***	***N61***	***N83***
GT1			I	291	248	209	160	342	169	274	358	209	168	145	119	265	087	306
Me49			II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	091	310
CTG			III	289	242	205	160	336	165	278	356	215	190	147	111	269	089	312
TgA15004			Africa I	291	242	207	160	342	165	278	354	223	166	142	111	277	097	310
DZ-Cat02	5 - 10 y	26.56	II (14/15)	NA	242	207	158	336	169	274	356	211	178	140	109	279	109	310
DZ-Cat07	3 - 5 y	20.84	II (15/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	217	178	142	125	273	115	310
DZ-Cat09	1 - 2 y	28.24	ND(4/15)	NA	244	NA	NA	NA	NA	274	NA	NA	176	140	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat12	3 - 5 y	28.23	II (8/15)	289	242	207	NA	NA	169	NA	356	NA	NA	145	111	NA	085	NA
DZ-Cat43	2 y	28.62	ND (3/15)	NA	NA	NA	NA	NA	169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	267	NA	308
DZ-Cat44	3 y	25.89	II (14/15)	289	242	207	158	336	169	274	NA	219	174	140	111	277	105	308
DZ-Cat52	10-15 y	26.26	II (14/15)	289	242	NA	158	336	169	274	356	219	174	140	111	287	095	308
DZ-Cat59	3 y	28.08	ND (4/15)	289	242	NA	NA	336	NA	NA	NA	NA	NA	140	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat71	1y	26.7	II (6/15)	289	242	NA	NA	336	169	NA	356	NA	NA	NA	119	NA	NA	NA
DZ-Cat72	10-15 y	26.21	II variant W35 (10/15)	289	244	207	158	336	NA	NA	NA	NA	176	140	113	259	NA	310
DZ-Cat78	3 y	25.83	II (13/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	NA	184	140	109	NA	101	310
DZ-Cat84	10-15 y	26.67	II (10/15)	289	NA	207	NA	336	169	274	356	NA	174	140	111	NA	NA	314
DZ-Cat86	3 y	23.29	II (15/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	219	174	140	113	259	105	312
DZ-Cat93	2y	25.69	II (7/15)	289	242	207	158	336	169	274	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat95	3 y	28.61	II (8/15)	289	242	207	NA	NA	169	NA	NA	NA	176	140	109	NA	NA	310

[a]Cycle quantitatif d'échantillons de cœur ; [b]Type de souches génotypées à l'aide de microsatellites multilocus ; ND: souche non déterminée ; NA: séquence non amplifiée ; Y: année

3. Discussion

Le premier objectif de la présente étude est de déterminer la séroprévalence de la toxoplasmose chez une population de chats errants dans la wilaya d'Alger.

Déterminer la séroprévalence de la toxoplasmose chez les chats errants est un moyen d'explorer le risque potentiel d'infection humaine provoquée par ces animaux.

Les taux de prévalence de la toxoplasmose chez le chat est diffèrent d'une région à l'autre dans le monde. En Afrique et en Asie, les taux de séropositivité varient respectivement entre 4,4-95,5% et 40-90% (Al-Kappany et al., 2011; Ayinmode et al., 2016; Haddadzadeh et al., 2006; Sharif et al., 2009; Tiao et al., 2013). En Europe, le taux de séropositivité est supérieur à 30%, variant entre 30,5 et 70,2% dans le nord de l'Italie (Spada et al., 2012), Espagne (Miro et al., 2004), et la Belgique (Dorny et al., 2002).En Amérique centrale et en Amérique du Sud, le taux de séropositivité était de 9,3 à 45,2%, respectivement (Dubey et al., 2009; Pena et al., 2006). Cependant, la comparaison des différentes enquêtes sérologiques chez les félidés semble difficile car la séroprévalence de *T.gondii* varie entre les populations sauvages et domestiques. Aussi cette comparaison est difficile car il existe des facteurs potentiellement confusionnels identifiés comme la méthode sérologique utilisée pour les tests, la taille des échantillons, la localisation géographique et le mode de vie des chats.

Dans la présente étude, la séroprévalence de la toxoplasmose chez des chats errants d'Alger (63 mâles, 33 femelles) est déterminée pour la première fois. En utilisant le test d'agglutination modifié (MAT) avec un seuil à 1: 6, le taux de séropositivité chez les chats errants est de 50%. Le test MAT a été choisi pour sa haute sensibilité et apparait être spécifique pour *T.gondii* , particulièrement pour les populations de chats (Dubey and Thulliez, 1989; Dubey et al., 1995; Dorny et al., 2002; Al-Kappany et al., 2010).

La séroprévalence de la toxoplasmose humaine est estimée en Algérie autour de 50% (Messerer et al., 2014). Ces données confirment un niveau élevé de circulation de *T. gondii* en Algérie pour lequel les chats jouent un rôle important. Par conséquent, les chats peuvent maintenir à un haut degré le risque de toxoplasmose humaine dans cette zone en contaminant l'environnement avec des oocystes. De plus, notre étude a été réalisée chez des chats errants en milieu urbain. Ces animaux errants, en raison de leurs habitudes de chasse, sont plus exposés au risque d'infection comparativement aux chats domestiques normalement nourris de nourriture commerciale et saine (Dorny et al., 2002).

Ces facteurs peuvent expliquer la séroprévalence relativement élevée (50%) observée dans notre étude. De plus ce taux élevé peut être expliqué par les conditions climatiques caractérisées par la chaleur et l'humidité de la région d'Alger et qui sont favorables à la survie des oocystes.

Un total de 31 sur 63 (49,2%) mâles et 17 sur 33 (51,5%) femelles sont positifs à *T.gondii* et aucune différence significative n'est observée entre la prévalence de l'infection et le sexe du chat, suggérant qu'ils ont un même degré de sensibilité à *T.gondii*. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs (Haddadzadeh et al., 2006; Pena et al., 2006; Salant and Spira, 2004) et (Spada et al., 2012).

Néanmoins, certaines études ont révélé une séroprévalence significativement plus élevée chez les mâles errants par rapport aux femelles (Miro et al., 2004). Cette observation peut être expliquée en considérant les habitudes territoriales, car les mâles ont une zone d'opération plus large que les femelles. Au contraire, Besné-Mérida et al. (2008) ont signalé une observation contraire, les femelles étant plus fréquemment infectées que les mâles(Besné-Mérida et al., 2008).

La présente étude montre une augmentation progressive de la prévalence avec l'âge. Cette dernière est plus faible chez les chats de moins d'un an, puis de ceux entre 1-2 ans, suivie des chats âgés de plus de deux ans. Probablement parce que les chats adultes sont plus exposés à *T. gondii* au cours de leur vie. Cette observation est en accord avec ce qui est habituellement rapporté dans la littérature(Afonsoa and Philippe Thulliez, 2006; Haddadzadeh et al., 2006; Pena et al., 2006).

L'étude moléculaire de *T. gondii* réalisée par PCR en temps réel chez les chats montre que la prévalence est de 90,6%, indépendamment du sexe. Cette technique moléculaire semble être plus sensible que la sérologie MAT. L'ADN parasitaire est détecté dans (85%) des échantillons de cœur provenant de chats séronégatifs. Inversement, plus de 95% des échantillons avec Cq<30 (amplifications tardives) sont également séropositifs.

En conséquence, l'accord entre ces deux méthodes augmente lorsque les échantillons négatifs et les amplifications tardives sont regroupés.

Ces résultats suggèrent que dans notre étude, le test MAT ne peut pas déceler les chats infectés avec une faible charge parasitaire. Ce fait encourage l'utilisation d'outils moléculaires lorsque cela est possible, pour améliorer les enquêtes épidémiologiques chez les animaux.

En effet, la PCR a été décrite comme une alternative sensible, spécifique et rapide pour détecter *T.gondii*(Hurtado et al., 2001). Il peut détecter l'ADN des parasites même lorsque les tissus disponibles pour le test sont en état de décomposition (Yai et al., 2003).

En outre, nous avons montré dans cette étude que la PCR en temps réel peut être utilisée pour détecter le parasite dans le cœur, la langue et les échantillons de rate issus des chats errants.
Il est intéressant de noter que dans notre étude, *T.gondii* est détecté plus souvent dans les échantillons de cœur que dans les autres organes chez les chats séropositifs.
On sait peu de choses sur la distribution tissulaire de *T.gondii* chez les chats(Dubey, 2010).
Des études récentes indiquent que *T. gondii* s'enkystent fréquemment dans les tissus extraneuronaux provenant d'animaux infectés naturellement et ou expérimentalement (Al-Kappany et al., 2010). Aussi il a été constaté que la densité de *T.gondii* dans le cœur est plus élevée. Il est également plus facile de retirer le cœur que le cerveau des chats pour les essais biologiques (Al-Kappany et al., 2010).

Le deuxième objectif de la présente étude est de déterminer la diversité génétique des souches de *T. gondii* circulant dans la population de chats d'Alger. C'est le premier communiqué du génotypage de *T. gondii* en Algérie.

Nos résultats ont montré une prédominance de la lignée clonale de type II chez les chats d'Alger. La majorité de nos échantillons correspond exactement au type II (11 échantillons d'ADN) et un est affecté à la variante de type II avec l'allèle spécifique 244 du marqueur W35 (DZ-Cat 72; tableau 6).
Un second échantillon d'ADN (DZ-Cat 09) appartient probablement au même génotype (allèle 244 du marqueur W35) mais le manque de marqueurs amplifiés ne permet pas de conclure. En effet, les marqueurs ne peuvent pas être amplifiés dans de nombreux échantillons d'ADN (12 génotypes incomplets).
Ce manque d'exhaustivité de l'ensemble des données peut s'expliquer par le fait que nous avons travaillé directement sur des échantillons de tissus, nous les avons congelés sans qu'ils n'aient été préalablement isolés par inoculation chez la souris, laquelle pourrait amplifier la quantité de parasites. Cela n'a pas été possible dans notre étude d'isoler le parasite par inoculation chez la souris pour des raisons logistiques (difficulté à stocker des organes à 4° C sur le terrain et absence d'installations de sécurité biologique de niveau 2 pour l'entretien des souris).

Le fait que les deux génotypes complets (15 marqueurs MS amplifiés), correspondent aux deux valeurs de cycle de quantification (Cq) les plus faibles (c'est-à-dire les 2 échantillons dont la concentration d'ADN sont les plus élevées) et que l'on observe une tendance à l'augmentation du nombre de marqueurs amplifiés lorsque les valeurs Cq sont inférieures à 27, soutient ces hypothèses citées en amont (tableau 6).

Nos résultats montrent néanmoins qu'il est toujours possible d'obtenir des données génétiques, même incomplètes, à partir de tissus tels que le cœur avec une logistique relativement simple par rapport à l'isolement des souches chez la souris. Nous devons néanmoins rester prudents sur nos résultats. D'où notre décision de considérer pour le typage, uniquement les échantillons amplifiés avec plus de 5 marqueurs, pour lesquels l'allocation pour un type donné est fiable (ici Type II ou de Type II variant). Pour les échantillons avec moins de 5 marqueurs amplifiés, même s'ils étaient des allèles de Type II, l'alternative des génotypes recombinants ne peut pas être exclue.

Cependant, les données génétiques apportées par notre étude semblent montrer qu'il existe une forte diversité au sein du type II à Alger car aucun clone n'a été observé dans le groupe de 7 souches avec au moins 10 marqueurs amplifiés (au moins un marqueur avec différents allèles).
Il aurait été intéressant de vérifier la diversité géographique des circonscriptions d'Alger pour étudier si cette diversité génétique est liée à la structure spatiale; Cependant ces données n'étaient pas disponibles dans notre étude par manque d'information épidémiologique.

Des études antérieures ont été réalisées sur le génotypage d'isolats de *T.gondii* chez des chats d'autres pays d'Afrique du Nord et d'Afrique de l'Est (Al-Kappany et al., 2010). Al-Kappany et al., ont génotypé *T.gondii* de chats sauvages égyptiens en utilisant 10 marqueurs PCR-RFLP sur 115 isolats. Leur étude révèle une majorité de souches de type II, ce qui est conforme avec nôtre étude. Cent trois isolats appartiennent au type II, 42 au type III et seulement 8 et 4 respectivement aux génotypes atypiques et aux infections mixtes (Al-Kappany et al., 2010).
Dans une autre étude portant sur 33 isolats de chats sauvages éthiopiens, les auteurs ont révélé que neuf de ces isolats correspondent au type II, cinq au type III, dix au type II variant et neuf a toxoDB # 20(Dubey et al., 2013).

De plus, une étude récente sur le génotypage chez des chats errants turcs utilisant l'analyse par MS montre que parmi les 22 isolats, 19 sont identifiés au type II, deux au type III et un au génotype Africa I(Can et al., 2014).

D'autres études ont été menées sur le génotypage de *T.gondii* chez des poulets de l'Afrique subsaharienne et de l'Afrique du Nord. Des études de génotypage Multilocus PCR-RFLP de 19 isolats de poulet de six pays africains ('Égypte, Kenya, Nigeria, Congo, Mali et le Burkina Faso)(Velmurugan et al., 2008), révèlent que 13 de ces isolats sont de type III, cinq ont des allèles de type II à tous les loci sauf apico qui appartient à la lignée de type II et un a un génotype atypique.
Lindstrom et al. (2008) ont trouvé l'ADN de *T. gondii* dans le cerveau de 20 poulets parmi 85 poulets naturellement exposés en Ouganda (Lindström et al., 2008). En utilisant PCR-RFLP avec cinq marqueurs, ils ont montré que six cas sont de type I, huit de type II, 1 de type III et cinq poulets hébergeaient des infections mixtes. Ces résultats révèlent que le type II se retrouve également chez d'autres espèces animales de nombreux pays d'Afrique, comme en Europe(Ajzenberg et al., 2002; Dubey et al., 2008; Dumètre et al., 2006).

Les résultats de la présente étude corroborent les conclusions antérieures selon lesquelles les lignées clonales de type II avec les lignées clonales de type III semblent prédominer chez les animaux domestiques de certaines régions d'Afrique (Lindström et al., 2008; Velmurugan et al., 2008) :l'Algérie, l'Égypte, le Mali, le Kenya et le Congo. Ces observations pourraient être associées à ce que nous avons observé dans la péninsule arabe, où les souches de Type II et III sont également répandues(Al-Kappany et al., 2010; Salant et al., 2009).

De manière assez surprenante, la souche clonale de type III était absente chez nos chats errants en Algérie. Ceci peut être probablement expliqué par la petite taille de l'échantillonnage, ou par d'autres biais non identifiés dans l'échantillonnage. Cependant, nos données montrent des similitudes entre les structures de population de *T. gondii* autour de la Méditerranée. Ces proximités génétiques à travers les différentes régions méditerranéennes pourraient être le résultat d'activités humaines (anthropisation)(Mercier et al., 2011)et les échanges commerciaux privilégiés entre ces pays (Mercier et al., 2010)depuis l'avènement de l'agriculture dans cette région il y a 10 000 ans, associée à la domestication des chats (Vigne et al., 2004).Cette hypothèse est renforcée par des études qui estiment que les lignées clonales II et III émergeaient à cette époque(Boyle et al., 2006; SU et al., 2003).

Cependant, il faut rester prudent sur ces observations en raison du petit nombre d'isolats étudiés, sur un nombre réduit de pays explorés associés à la diversité des marqueurs génétiques utilisés à travers les études et le génotypage parfois incomplet, rendant la comparaison incertaine. De plus, des génotypes non classiques du parasite associés à une plus grande diversité génétique ont été décrits dans d'autres pays d'Afrique occidentale et centrale à partir de souches animales et humaines (Ajzenberg et al., 2009, 2004; Mercier et al., 2010) . Dans ces études, après un génotypage multilocus utilisant des marqueurs MS, un seul de ces isolats est de type II, 41 de type III et 44 ont un génotype mixte impliquant des allèles de type I et / ou de type II et / ou de type III (Africa 1, 2 et 3), habituellement avec une majorité d'allèles de type I (Ajzenberg et al., 2009, 2004; Mercier et al., 2010). La plus grande proportion de génotypes non archétypiques diffère des études africaines précédentes.

La diversité génétique réduite pour au moins l'Afrique du Nord, est en contraste avec *T. gondii* d'Amérique du Sud, où les populations de parasites sont très diverses (Lehmann et al., 2006; Pena et al., 2008). Ceci est notamment illustré par la plupart des isolats de chats du Brésil ou de Guyane qui sont virulents chez la souris (Dubey et al., 2004; Mercier et al., 2011; Pena et al., 2008). Parmi les 46 souches génotypées de *T. gondii* provenant de chats de Sao Paulo (Brésil), 20 sont sans génotypes clonaux de types I, II ou III (Dubey et al., 2004; Pena et al., 2008). En Guyane, deux souches de génotypes atypiques ont été isolées chez des chats errants de la ville de Cayenne provoquant la mort des souris avant 20 jours après l'inoculation(Mercier et al., 2011).

Sur la base de nos résultats, nous pouvons conclure que le génotype II de *T.gondii* est prédominant chez les chats d'Alger. Cependant, l'absence de type III dans notre étude et la description récente d'une plus grande diversité génétique de *Toxoplasma* dans certaines régions d'Afrique (Ajzenberg et al., 2009, 2004; Mercier et al., 2010) doit promouvoir de nouvelles explorations de la diversité génétique de *T. gondii*.

La diversité génétique en Afrique est importante pour élucider l'histoire évolutive de *T. gondii* et surtout pour comprendre la variété des formes cliniques. Plusieurs études ont plaidé pour un rôle des génotypes dans l'expression clinique de la toxoplasmose(Carme et al., 2002; Dardé, 2008; De Salvador-Guillouët et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Gallego et al., 2006; Mercier et al., 2010) et dans le cas de l'Afrique, certaines caractéristiques de la pathogénicité de la toxoplasmose humaine semblent émerger (Gilbert et al., 1999; Ronday et al., 1996).

Par conséquent, d'autres études épidémiologiques moléculaires plus larges sont nécessaires pour isoler éventuellement d’autres génotypes dans d'autres régions d 'Algérie, et plus largement à travers le continent africain.

Conclusion

L'aspect zoonotique mondial de la toxoplasmose en fait une parasitose de première importance ciblée par les organisations de santé publique comme l'organisation mondiale de la santé, qui recommande continuellement la collecte de données épidémiologiques sur l'infection parasitaire. De telles données sont primordiales pour déterminer l'importance relative des différentes sources d'infection humaine, pour contrôler la maladie et ses conséquences. Cependant, très peu de pays dans le monde exercent une surveillance épidémiologique de l'infection humaine, et encore moins de la toxoplasmose animale.

En Afrique du Nord les données épidémiologiques sur *T. gondii* restent limitées et particulièrement en Algérie aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Ce qui nous à incité à mener pour la première fois une enquêté chez les chats errants, vu qu'ils restent la source initiale de contamination de l'environnement et indirectement de l'homme.

Notre étude révèle un taux de séropositivité de 50% chez les chats errants d'Alger à l'aide du test d'agglutination modifié (MAT). Ce taux élevé est la preuve d'un haut niveau de circulation de *T. gondii* en Algérie pour lequel les chats jouent un rôle important. En tant qu'hôtes définitifs, assurant la dissémination d'une forme infectante (oocyste), les chats tiennent une place primordiale dans le cycle épidémiologique. Ils sont la source d'une contamination de l'environnement. Par conséquent, la population de chats errants contaminés d'Alger ne peut que faciliter et permettre un haut degré de contamination de la toxoplasmose humaine en Algérie.

Le deuxième objectif de la présente étude est de déterminer la diversité génétique des souches de *T. gondii* circulant dans la population de chats d'Alger. Nos résultats montrent une prédominance de la lignée clonale de type II chez les chats d'Alger (Algérie).
Sur la base de nos résultats, nous pouvons conclure que le génotype II de *T.gondii* est prédominant chez les chats d'Alger (Algérie).

Une meilleure connaissance de la diversité génétique de *T. gondii* en Algérie est fondamentale pour la conception de nouvelles stratégies de contrôle et de surveillance de ce parasite. Pour cela, d'autres études épidémiologiques moléculaires plus larges chez le chat

ainsi que chez d'autres espèces animales, sont nécessaires pour isoler éventuellement d'autres génotypes dans d'autres régions d 'Algérie.

Aussi une meilleure compréhension de la distribution et de la diversité génétique du toxoplasme en Algérie est cruciale afin d'évaluer les risques en terme de santé publique où ce parasite semble plus pathogène

1. Afonsoa, E., Philippe Thulliez, E.G.-F., 2006. Transmission of Toxoplasma gondii in an urban population of domestic cats (Felis catus). Int. J. Parasitol. 36, 1373–1382.
2. Afssa, 2005. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation Rapport du groupe de travail "Toxoplasma gondii" de l'Afssa. Afssa 1 – 318.
3. Ajioka, J.W., Soldati, D., 2007. Genetics and genome organization of Toxoplasma gondii, in: Biochemistry and Cell Biology.
4. Ajzenberg, D., Bañuls, a. L., Su, C., Dumètre, a., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L., 2004a. Genetic diversity, clonality and sexuality in Toxoplasma gondii. Int. J. Parasitol. 34, 1185–1196. doi:10.1016/j.ijpara.2004.06.007
5. Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L., 2004b. Genetic diversity, clonality and sexuality in Toxoplasma gondii. Int. J. Parasitol. 34, 1185–1196. doi:10.1016/j.ijpara.2004.06.007
6. Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., Dardé, M.-L., 2002. Genotype of 86 Toxoplasma gondii isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J. Infect. Dis. 186, 684–689. doi:10.1086/342663
7. Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.L., 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. J. Clin. Microbiol. 48, 4641–4645. doi:10.1128/JCM.01152-10
8. Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J., Aubert, D., Franck, J., Bessières, M.-H., Quinio, D., Pelloux, H., Delhaes, L., Desbois, N., Thulliez, P., Robert-Gangneux, F., Kauffmann-Lacroix, C., Pujol, S., Rabodonirina, M., Bougnoux, M.-E., Cuisenier, B., Duhamel, C., Duong, T.H., Filisetti, D., Flori, P., Gay-Andrieu, F., Pratlong, F., Nevez, G., Totet, A., Carme, B., Bonnabau, H., Dardé, M.-L., Villena, I., 2009. Genotype of 88 Toxoplasma gondii isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. J. Infect. Dis. 199, 1155–1167. doi:10.1086/597477
9. Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., Boothroyd, J.C., 2005. Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: A collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog. 1, 0137–0149. doi:10.1371/journal.ppat.0010017

10. Al-Kappany, Y.M., Lappin, M.R., Kwok, O.C.H., Abu-Elwafa, S. a, Hilali, M., Dubey, J.P., 2011. Seroprevalence of Toxoplasma gondii and concurrent Bartonella spp., feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, and Dirofilaria immitis infections in Egyptian cats. J. Parasitol. 97, 256–8. doi:10.1645/GE-2654.1
11. Al-Kappany, Y.M., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Abu-Elwafa, S. a, Hilali, M., Dubey, J.P., 2010. High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: isolation of viable Toxoplasma gondii, tissue distribution, and isolate designation. J. Parasitol. 96, 1115–1118. doi:10.1645/GE-2554.1
12. ANOFEL, n.d. Toxoplasmose. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie. http://www.anofel.net/ [WWW Document].
13. Ashburn, D., Chatterton, J., Evans, R., Joss, A., Ho-Yen, D., 2001. Success in the toxoplasma dye test. J. Infect. 42, 16–9.
14. Aubert, D., Ajzenberg, D., Richomme, C., Gilot-Fromont, E., Terrier, M.E., de Gevigney, C., Game, Y., Maillard, D., Gibert, P., Dardé, M.L., Villena, I., 2010. Molecular and biological characteristics of Toxoplasma gondii isolates from wildlife in France. Vet. Parasitol. 171, 346–349.
15. Aurélien, D., 2005. Contribution à la détection de Toxoplasma gondii dans l'environnement et dans des réservoirs animaux. Limoge.
16. Ayinmode, A.B., Oluwayelu, D.O., Babalola, E.T., 2016. Serologic Survey of Toxoplasma gondii Antibodies in cats (Felis catus) sold at live animal markets in Southwestern Nigeria. Bulg. J. Vet. Med. doi:10.15547/bjvm.957
17. Barford, E., 2013. Parasite makes mice lose fear of cats permanently. Nature 13777.
18. Barragan, A., Sibley, L.D., 2002. Transepithelial migration of Toxoplasma gondii is linked to parasite motility and virulence. J. Exp. Med. 195, 1625–1633. doi:10.1084/jem.20020258
19. Benjaballah, S., 2006. rôle prophylactique de la fourrière canine. Journée de formation sur les MTH et les zoonoses. El-Harrach. Alger.
20. Besné-Mérida, A., Figueroa-Castillo, J.A., Martínez-Maya, J.J., Luna-Pastén, H., Calderón-Segura, E., Correa, D., 2008. Prevalence of antibodies against Toxoplasma gondii in domestic cats from Mexico City. Vet. Parasitol. 157, 310–313. doi:10.1016/j.vetpar.2008.06.019
21. Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 607–623. doi:10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000

22. Boisson, D., 2002. Etude bibliographique de la toxoplasmose feline: aspects clinique et conduite du vétérinaire en clientèle, lors d'une suspicion de toxoplasmose féline.
23. Bouratbine, A., Siala, E., Chahed, M.K., Aoun, K., R, B.E.N.I., 2001. Profil séro-épidémiologique de la t oxoplasmose au nord de la tunisie 61–66.
24. Boyle, J.P., Rajasekar, B., Saeij, J.P.J., Ajioka, J.W., Berriman, M., Paulsen, I., Roos, D.S., Sibley, L.D., White, M.W., Boothroyd, J.C., 2006. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like Toxoplasma gondii. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 10514–10519. doi:10.1073/pnas.0510319103
25. Can, H., Döşkaya, M., Ajzenberg, D., Özdemir, H.G., Caner, A., Iz, S.G., Döşkaya, A.D., Atalay, E., Çetinkaya, Ç., Ürgen, S., Karaçali, S., Ün, C., Dardé, M.L., Gürüz, Y., 2014. Genetic characterization of Toxoplasma gondii isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of Izmir, Turkey. PLoS One 9. doi:10.1371/journal.pone.0104930
26. Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, a M., Peneau, C., Dardé, M.L., Demar, M., Neron, P., Darde, M.L., 2002. Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana. J. Clin. Microbiol. 40, 4037–4044. doi:10.1128/JCM.40.11.4037
27. Carme, B., Demar, M., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., 2009. Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of Toxoplasma gondii, French Guiana. Emerg. Infect. Dis. 15, 656–658. doi:10.3201/eid1504.081306
28. Cook, a J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. a, Foulon, W., Semprini, a E., Dunn, D.T., 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ 321, 142–147. doi:10.1136/bmj.321.7254.142
29. Dardé, M., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1992. Isoenzyme analysis of 35 Toxoplasma gondii isolates and the biological and epidemiological implications. J Parasitol. 78, 786–94.
30. Dardé, M.L., 2008. Toxoplasma gondii, "new" genotypes and virulence. Parasite 15, 366–71.
31. De Craeye, S., Speybroeck, N., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Collinet, F., Tavernier, P., Van Gucht, S., Dorny, P., Dierick, K., 2011. Toxoplasma gondii and Neospora

caninum in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? Vet. Parasitol. 178, 64–69. doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.016

32. De Salvador-Guillouët, F., Ajzenberg, D., Chaillou-Opitz, S., Saint-Paul, M., Dunais, B., Dellamonica, P., Marty, P., 2006. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of Toxoplasma gondii in an immunocompetent young man. J. Infect. 53, 47–50.
33. Desmonts, G., Couvreur, J., Alison, F., Baudelot, J., Gerbeaux, J., Lelong, M., 1965. Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. Rev Fr Etudes Clin Biol 10, 952–58.
34. Desmonts, G., Remington, J.S., 1980. Direct Agglutination Test for Diagnosis of Toxoplasma Infection: Method for Increasing Sensitivity and Specificity. J. Clin. Microbiol. 11, 562–568. doi:0095-1 137/80/06-0562/07$02.00/0
35. Dion, S., 2010. Place du chat dans la circulation la toxoplasmose.
36. Dorny, P., Speybroeck, N., Verstraete, S., Baeke, M., De Becker, A., Berkvens, D., Vercruysse, J., 2002. Serological survey of Toxoplasma gondii, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. Vet. Rec. 115, 626–629.
37. Dos Santos, T., Nunes, C., Luvizotto, M., de Moura, A., Lopes, W., da Costa, A., Bresciani, K., 2010. Detection of Toxoplasma gondii oocysts in environmental samples from public schools. Vet. Parasitol. 171, 53–7.
38. Dubey, J., 1998. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. Int J Parasitol 28, 1019–24.
39. Dubey, J., 1996. Pathogenicity and infectivity of Toxoplasma gondii oocysts for rats. J Parasitol. 82, 951–6.
40. Dubey, J., 1992. Isolation of Toxoplasma gondii from a naturally infected beef cow. J. Parasitol. 78, 151–3.
41. Dubey, J., Frenkel, J., 1973. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. J Parasitol. 59, 505–12.
42. Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of animals and humans, Second edi. ed. Beltsville, Marylan, U.S.A.
43. Dubey, J.P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G. V, Bandini, L. a, Kwok, O.C.H., Hill, R., Su, C., 2007. Molecular and biological characterization of Toxoplasma gondii isolates from free-range chickens from Guyana, South America,

identified several unique and common parasite genotypes. Parasitology 134, 1559–65. doi:10.1017/S0031182007003083

44. Dubey, J.P., Choudhary, S., Tilahun, G., Tiao, N., Gebreyes, W. a., Zou, X., Su, C., 2013. Genetic diversity of Toxoplasma gondii isolates from Ethiopian feral cats. Vet. Parasitol. 196, 206–208. doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.015
45. Dubey, J.P., Darrington, C., Tiao, N., Ferreira, L.R., Choudhary, S., Molla, B., Saville, W.J. a, Tilahun, G., Kwok, O.C.H., Gebreyes, W. a, 2013. Isolation of viable Toxoplasma gondii from tissues and feces of cats from Addis Ababa, Ethiopia. J. Parasitol. 99, 56–8. doi:10.1645/GE-3229.1
46. Dubey, J.P., Desmonts, G., 1987. Serological responses of equids fed Toxoplasma gondii oocysts. Equine Vet. J. 19, 337–339.
47. Dubey, J.P., Huong, L.T.T., Lawson, B.W.L., Subekti, D.T., Tassi, P., Cabaj, W., Sundar, N., Velmurugan, G. V, Kwok, O.C.H., Su, C., 2008. Seroprevalence and isolation of Toxoplasma gondii from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. J. Parasitol. 94, 68–71. doi:10.1645/GE-1362.1
48. Dubey, J.P., Lappin, M.R., Thulliez, P., 1995. Long-Term Antibody Responses of Cats Fed Toxoplasma gondii Tissue Cysts. J. Parasitol. 81, 887–893.
49. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C. a., 1998. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev. 11, 267–299. doi:PMC106833
50. Dubey, J.P., Miller, N.L., Frenkel, J.K., 1970. The Toxoplasma gondii oocyst from cat feces. J. Exp. Med. 132, 636–662. doi:10.1084/jem.132.4.636
51. Dubey, J.P., Navarro, I.T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R.L., Kawabata, H.H., Vianna, M.. C.B., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., Thulliez, P., Lehmann, T., 2004. Toxoplasma gondii ingections in cats from parana, Brazil: seroprevalence , tissu distribution , and biologic and genetic Characterization of isolates. J. Parasitol. 90, 721–726.
52. Dubey, J.P., Speer, C.A., Shen, S.K., Kwok, O.C., Blixt, J.A., 1997. Oocyst-Induced Murine Toxoplasmosis: Life Cycle, Pathogenicity, and Stage Conversion in Mice Fed Toxoplasma Gondii Oocysts. J Parasitol. 83, 870–882.
53. Dubey, J.P., Thulliez, P., 1989. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed Toxoplasma gondii tissue cysts. J. Am. Vet. Med. Assoc. 194, 1297–1299.
54. Dubey, J.P., Velmurugan, G. V, Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., González-Herrera, a, Ferreira, L.R., Kwok,

O.C.H., Su, C., 2009. Isolation of Toxoplasma gondii from animals in Durango, Mexico. J. Parasitol. 95, 319–322. doi:10.1645/GE-1874.1

55. Dumètre, A., Ajzenberg, D., Rozette, L., Mercier, A., Dardé, M.L., 2006. Toxoplasma gondii infection in sheep from Haute-Vienne, France: Seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. Vet. Parasitol. 142, 376–379. doi:10.1016/j.vetpar.2006.07.005
56. Dumètre, A., Dardé, M.L., 2003. How to detect Toxoplasma gondii oocysts in environmental samples? FEMS Microbiol. Rev. 27, 651–661. doi:10.1016/S0168-6445(03)00071-8
57. El Deeb, H.K., Salah-Eldin, H., Khodeer, S., Allah, A.A., 2012. Prevalence of Toxoplasma gondii infection in antenatal population in Menoufia governorate, Egypt. Acta Trop. 124, 185–191. doi:10.1016/j.actatropica.2012.08.005
58. El Mansouri, B., Rhajaoui, M., Sebti, F., Amarir, F., Laboudi, M., Bchitou, R., Hamad, M., Lyagoubi, M., 2007. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Rabat, Morocco. Sante Publique (Paris). 289–290.
59. Elmore, S. a., Jones, J.L., Conrad, P. a., Patton, S., Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2010. Toxoplasma gondii: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends Parasitol. 26, 190–196. doi:10.1016/j.pt.2010.01.009
60. Etheredge, G.D., Michael, G., Muehlenbein, M.P., Frenkel, J.K., 2004. The roles of cats and dogs in the transmission of Toxoplasma infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. Rev. Panam. salud publica/Pan Am. J. public Heal. 16, 176–186. doi:10.1590/S1020-49892004000900004
61. Euzéby, J., 1997. Les parasites des viandes : Épidémiologie, physiopathologie, incidences zoonosiques.
62. Ferreira, A. de M., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian Toxoplasmagondii strains by multilocus PCR–RFLP. Infect. Genet. Evol. 6, 22–31.
63. Ferreira, I., Vidal, J., Costa-Silva, T., Meira, C., Hiramoto, R., Penalva de Oliveira, A., Pereira-Chioccola, V., 2008. Toxoplasma gondii: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. Exp. Parasitol. 118, 221–7.
64. Fichera, M.E., Roos, D.S., 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature 390, 407–409.

65. Filisetti, D., Candolfi, E., 2004. Immune response to Toxoplasma gondii. Ann Ist Super Sanita 40, 71–80.
66. Flori, P., Hafid, J., Bourlet, T., Raberin, H., Genin, C., Tran Manh Sung, R., 2002. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: Use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. J. Med. Microbiol. 51, 871–878. doi:10.1099/0022-1317-51-10-871
67. Frenkel, J.., 1973. Toxoplasma In and Around Us. Bioscience 23, 343–352.
68. Gallego, C., Saavedra-Matiz, C., Gómez-Marín, J.E., 2006. Direct genotyping of animal and human isolates of Toxoplasma gondii from Colombia (South America). Acta Trop. 97, 161–167.
69. García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Martínez, F., Vargas, a., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, a., Almería, S., 2010. Factors affecting seroprevalence of Toxoplasma gondii in the endangered Iberian lynx (Lynx pardinus). Vet. Parasitol. 167, 36–42. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.044
70. Garcia-Méric, P., Franck, J., Dumon, H., Piarroux, R., 2010. Prise en charge de la toxoplasmose congénitale en France : données actuelles. Presse Med. 39, 530–538.
71. Gashout, A., Amro, A., Erhuma, M., Al-Dwibe, H., Elmaihub, E., Babba, H., Nattah, N., Abudher, A., 2016. Molecular diagnosis of Toxoplasma gondii infection in Libya. BMC Infect. Dis. 16, 157. doi:10.1186/s12879-016-1491-5
72. Gatkowska, J., Wieczorek, M., Dziadek, B., Dzitko, K., Dlugonska, H., 2012. Behavioral changes in mice caused by Toxoplasma gondii invasion of brain. Parasitol. Res. 111, 53–58. doi:10.1007/s00436-011-2800-y
73. Gendrin, C., 2007. Etude de l ’adressage des protéines GRAs transmembranaires de Toxoplasma gondii aux granules denses et de leur insertion membranaire post-sécrétoire.
74. Gilbert, R.E., Dunn, D.T., Lightman, S., Murray, P.I., Pavesio, C.E., Gormley, P.D., Masters, J., Parker, S.P., Stanford, M.R., 1999. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. Epidemiol. Infect. 123, 283–9. doi:10.1017/S0950268899002800
75. Grigg, M., Bonnefoy, S., Hehl, A., Suzuki, Y., Boothroyd, J., 2001. Success and virulence in Toxoplasma as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science (80-.). 294, 161–165.
76. Haddadzadeh, H.R., Khazraiinia, P., Aslani, M., Rezaeian, M., Jamshidi, S., Taheri, M., Bahonar, a., 2006. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in stray and

household cats in Tehran. Vet. Parasitol. 138, 211–216. doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.010

77. Hammond-Aryee, K., Student, M., Mmed, E., 2014. Toxoplasma gondii seroprevalence studies on humans and animals in Africa. South African Fam. Pract. 119, 119–124. doi:10.1080/20786204.2014.10855349
78. Hauser, W.J., Sharma, S., Remington, J., 1983. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of Toxoplasma gondii. J. Immunol. 131, 458–63.
79. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/technology. doi:10.1038/nbt0993-1026
80. Hill, D., Dubey, J.P., 2002. Toxoplasma gondii: Transmission, diagnosis, and prevention. Clin. Microbiol. Infect. 8, 634–640. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x
81. Holliman, R.., Barker, K.., Johnson, J.., 1990. Selective antenatal screening for toxoplasmosis and the latex agglutination test. Epidemiol. Infect. 105, 409–414.
82. Howe, D., Sibley, L., 1995. Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis 172, 1561–6.
83. Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. J. Infect. Dis. 172, 1561–1566.
84. Howe, K.D., Sibley, L.D., 1995. Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages : Correlation of Parasite Genotype with Human Disease Author (s): Daniel K . Howe and L . David Sibley Published by : Oxford University Press Stable URL : http://www.jstor.org/stable/30134669 Accessed : J. Infect. Dis. 172, 1561–1566.
85. Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García-Pérez, A.L., 2001. Single tube nested PCR for the detection of Toxoplasma gondii in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet. Parasitol. 102, 17–27. doi:10.1016/S0304-4017(01)00526-X
86. Hutchison, W., 1967a. The nematode transmission of Toxoplasma gondii. Trans R Soc Trop Med Hyg. 61, 80–9.
87. Hutchison, W., 1967b. The nematode transmission of Toxoplasma gondii. Trans R Soc Trop Med Hyg 61, 80–9.
88. Hutchison, W., Pittilo, R., Ball, S., Siim, J., 1979. Toxoplasma Gondii: scanning electron microscope studies on the small intestine of infected and uninfected cats. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 87, 393–5.

89. Jones, J.L., Dubey, J.P., 2012. Foodborne toxoplasmosis. Clin. Infect. Dis. 55, 845–851. doi:10.1093/cid/cis508
90. Kieffer, F., Wallon, M., 2013. Congenital toxoplasmosis. Handb Clin Neurol 112, 1099–101.
91. Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics 33, 159–174.
92. Laure, B.R., 2006. Enquête coprologique sur la toxoplasmose dans la population des chats de la ville de Dakar.
93. Lehmann, T., Graham, D., Dahl, E., Bahia-Oliveira, L., Gennari, S., Dubey, J., 2004. Variation in the structure of Toxoplasma gondii and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. Infect Genet Evol. 4, 107–14.
94. Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J.L., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2003. Transmission dynamics of Toxoplasma gondii on a pig farm. Infect. Genet. Evol. 3, 135–141. doi:10.1016/S1567-1348(03)00067-4
95. Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P., 2006. Globalization and the population structure of Toxoplasma gondii. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 11423–8. doi:10.1073/pnas.0601438103
96. Lindsay, D., Blagburn, B., Braund, K., 1995. A review of Toxoplasma gondii and muscular toxoplasmosis.
97. Lindsay, D., Dubey, J., Blagburn, B., 1997. FELINE TOXOPLASMOSIS AND THE IMPORTANCE OF THE TOXOPLASMA GONDII OOCYSTS. J. Alabama Acad. Sci.
98. Lindström, I., Sundar, N., Lindh, J., Kironde, F., Kabasa, J.D., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P., Smith, J.E., 2008. Isolation and genotyping of Toxoplasma gondii from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. Parasitology 135, 39–45. doi:10.1017/S0031182007003654
99. Liu, Q., Wang, Z., Huang, S., Zhu, X., 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of Toxoplasma gondii. Parasit. Vectors 1, 1–14. doi:10.1186/s13071-015-0902-6
100. Lopes, A.P., Granada, S., Oliveira, A.C., Brancal, H., Dubey, J.P., Cardoso, L., Vilhena, H., 2014. Toxoplasmosis in dogs: first report of Toxoplasma gondii infection in any animal species in Angola. Pathog. Glob. Health 108, 344–346. doi:10.1179/2047773214Y.0000000160
101. Lunde, M., Jacobs, L., 1983. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of Toxoplasma gondii. J. Parasitol. 69, 806–8.

102. Lundén, A., Uggla, A., 1992. Infectivity of Toxoplasma gondii in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. Int J Food Microbiol 15, 357–63.

103. Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 30, 1292–305. doi:10.1093/nar/30.6.1292

104. Meerburg, B.G., De Craeye, S., Dierick, K., Kijlstra, a., 2012. Neospora caninum and Toxoplasma gondii in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. Vet. Parasitol. 184, 317–320. doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.001

105. Mercier, A., 2010. Approche écologique, épidémiologique et génétique de la biodiversité de Toxoplasma gondii en zone tropicale humide : exemples du Gabon et de la Guyane Française. Thèse. Univ. Limoges.

106. Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M., de Thoisy, B., Bonnabau, H., Collinet, F., Boukhari, R., Blanchet, D., Simon, S., Carme, B., Dardé, M., 2011. Human impact on genetic diversity of Toxoplasma gondii: example of the anthropized environment from French Guiana. Infect. Genet. Evol. 11, 1378–1387.

107. Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Banuls, A.-L., Durand, P., Salle, B., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., 2010. Additional haplogroups of Toxoplasma gondii out of Africa: Population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. PLoS Negl. Trop. Dis. 4. doi:10.1371/journal.pntd.0000876

108. Messerer, L., Bouzbid, S., Gourbdji, E., Mansouri, R., Bachi, F., 2014. Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes dans la wilaya d'Annaba, Algérie. Rev. Epidemiol. Sante Publique 62, 160–165. doi:10.1016/j.respe.2013.11.072

109. Miro, G., Montoya, A., Jiménez, S., Frisuelos, C., Mateo, M., Fuentes, I., 2004. Prevalence of antibodies to Toxoplasma gondii and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. Vet. Parasitol. 126, 249–255. doi:10.1016/j.vetpar.2004.08.015

110. Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. Lancet 363, 1965–1976. doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X

111. Mordue, D.G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. a, Sibley, L.D., 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. J. Immunol. 167, 4574–4584. doi:10.4049/jimmunol.167.8.4574

112. Nicolle, C., Manceaux, L., 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondii : toxoplasme. Arch. Inst. Pasteur Tunis 2, 97–103.

113. Oncel, T., Vural, G., Babur, C., Kilic, S., 2005. Detection of Toxoplasmosis gondii seropositivity in sheep in Yalova by Sabin Feldman Dye Test and Latex Agglutination Test. Turkiye Parazitol Derg 29, 10–12.

114. Opsteegh, M., Teunis, P., Mensink, M., Züchner, L., Titilincu, A., Langelaar, M., van der Giessen, J., 2010. Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of Toxoplasma gondii seroprevalence in Dutch sheep using mixture models. Prev Vet Med 96, 232–40.

115. Pappas, G., Roussos, N., Falagas, M.E., 2009. Toxoplasmosis snapshots: Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int. J. Parasitol. 39, 1385–1394. doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.003

116. Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of Toxoplasma gondii in Brazil. Int. J. Parasitol. 38, 561–569. doi:10.1016/j.ijpara.2007.09.004

117. Pena, H.F.J., Soares, R.M., Amaku, M., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2006. Toxoplasma gondii infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res. Vet. Sci. 81, 58–67. doi:10.1016/j.rvsc.2005.09.007

118. Petersen, E., Dubey, J.P., 2001. Biology of toxoplasmosis. Toxoplasmosis A Compr. Clin. Guid. 1–42.

119. Pfefferkorn, E., Pfefferkorn, L., Colby, E., 1977. Development of gametes and oocysts in cats fed cysts derived from cloned trophozoites of Toxoplasma gondii. J. Parasitol. 63, 158–9.

120. Pinon, J.M., Dumon, H., Chemla, C., Franck, J., Petersen, E., Zufferey, J., Bessieres, M., Marty, P., Holliman, R., Johnson, J., Luyasu, V., Lecolier, B., Guy, E., Decoster, a, Enders, G., Pelloux, H., Candolfi, E., 2001. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis : Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G , M , and A Antibodies Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis : Evaluati. J. Clin. Microbiol. 39, 2267–2271. doi:10.1128/JCM.39.6.2267

121. Poitras, E., Houde, a, 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. Rev. Biol. Biotechnol. 2, 2–11.

122. Prestrud, K.W., Dubey, J.P., Asbakk, K., Fuglei, E., C.Su, 2008. First isolate of Toxoplasma gondii from arctic fox (Vulpes lagopus) from Svalbard. Vet. Parasitol. 151, 110–114. doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.011

123. Priet, A., 2003. Apport de la PCR en temps réel dans le diagnostic de la toxoplasmose anténatal de la toxoplasmose.

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

125. Robben, P.M., Mordue, D.G., Truscott, S.M., Takeda, K., Akira, S., Sibley, L.D., 2004. Production of IL-12 by macrophages infected with Toxoplasma gondii depends on the parasite genotype. J Immunol 172, 3686–3694. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3686

126. Robert-Gangneux, F., Dardé, M.L., 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Rev. 25, 264–296. doi:10.1128/CMR.05013-11

127. Ronday, M.J., Stilma, J.S., Barbe, R.F., McElroy, W.J., Luyendijk, L., Kolk, a H., Bakker, M., Kijlstra, a, Rothova, a, 1996. Aetiology of uveitis in Sierra Leone, west Africa. Br. J. Ophthalmol. 80, 956–61. doi:10.1136/bjo.80.11.956

128. Salant, H., Spira, D.T., 2004. A cross-sectional survey of anti-Toxoplasma gondii antibodies in Jerusalem cats. Vet. Parasitol. 124, 167–177. doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.011

129. Salant, H., Weingram, T., Spira, D.T., Eizenberg, T., 2009. An outbreak of Toxoplasmosis amongst squirrel monkeys in an Israeli monkey colony. Vet. Parasitol. 159, 24–29. doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.011

130. Sato, K., Iwamoto, I., Yoshiki, K., 1993. Experimental toxoplasmosis in pregnant cats. J Vet Med Sci. 55, 1005–9.

131. Sharif, M., Daryani, A., Nasrolahei, M., Ziapour, S.P., 2009. Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in stray cats in Sari, northern Iran. Trop. Anim. Health Prod. 41, 183–187. doi:10.1007/s11250-008-9173-y

132. Sibley, L., Ajioka, J., 2008a. Population structure of Toxoplasma gondii: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. Annu Rev Microbiol 62, 329–51.

133. Sibley, L., Ajioka, J., 2008b. Population structure of Toxoplasma gondii: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. Annu Rev Microbiol 62, 329–51.

134. Sibley, L.D., 2009. Developement of forward genetics in Toxoplasma gondii. Int J Parasitol 39, 915–924. doi:10.3816/CLM.2009.n.003.Novel

135. Sibley, L.D., Boothroyd, C.J., 1992. Virulent strains of Toxoplasma gondiicomprise a single clonal lineage. Nature 359, 82–85.

136. Sims, T. a, Hay, J., Talbot, I.C., 1989. An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of Toxoplasma tissue cysts within the brains of mice with congenital toxoplasmosis. Br. J. Exp. Pathol. 70, 317–25.

137. Soete, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J., 1993. Toxoplasma gondii: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. Exp Parasitol 76, 259–64.

138. Spada, E., Proverbio, D., della Pepa, A., Perego, R., Baggiani, L., DeGiorgi, G.B., Domenichini, G., Ferro, E., Cremonesi, F., 2012. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and Toxoplasma gondii in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data. J. Feline Med. Surg. 14, 369–77. doi:10.1177/1098612X12437352

139. Splendor, A., 1909. Un nuovo protozoa parasite deconigli d'une malattia che ricorda in molti punti il bala-azar dell' uoma. Rev.Soc.Sci.Sao Paulo 3, 109–112.

140. SU, C., Evans, D., Cole, R., Kissinger, J., Ajioka, J., Sibley, L., 2003. Recent expansion of Toxoplasma through enhanced oral transmission. Science (80-.). 299, 414–6.

141. Su, C., Howe, D.K., Dubey, J.P., Ajioka, J.W., Sibley, L.D., 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in Toxoplasma gondii. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 10753–10758. doi:10.1073/pnas.172117099

142. Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 5844–9. doi:10.1073/pnas.1203190109

143. Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of Toxoplasma gondii. Parasitology 137, 1–11. doi:10.1017/S0031182009991065

144. Subauste, C., Wessendarp, M., 2000. Human dendritic cells discriminate between viable and killed Toxoplasma gondii tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell pro. J. Immunol. 165, 1498–505.

145. Sucilathangam, G., Palaniappan, N., Sreekumar, C., Anna, T., 2010. IgG - Indirect fluorescent antibody technique to detect seroprevalence of Toxoplasma gondii in immunocompetent and immunodeficient patients in southern districts of Tamil Nadu. Indian J. Med. Microbiol. 28, 354–357.

146. Tenter, a M., Heckeroth, a R., Weiss, L.M., 2000. Toxoplasma gondii: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30, 1217–58. doi:10.1016/S0020-7519(00)00124-7

147. Tiao, N., Darrington, C., Molla, B., Saville, W.J. a, Tilahun, G., Kwok, O.C.H., Gebreyes, W. a, Lappin, M.R., Jones, J.L., Dubey, J.P., 2013. An investigation into the seroprevalence of Toxoplasma gondii, Bartonella spp., feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukaemia virus (FeLV) in cats in Addis Ababa, Ethiopia. Epidemiol. Infect. 141, 1029–33. doi:10.1017/S0950268812001707

148. Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bénet, J.J., Ellis, P., Moutou, F., Louzä, a., 1996. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Médecine Mal. Infect. 26, 686. doi:10.1016/S0399-077X(96)80098-9

149. Tomavo, S., 2001. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of Toxoplasma gondii: an adaptive developmental strategy. Int J Parasitol 31, 1023–31.

150. Udonsom, R., Buddhirongawatr, R., Sukthana, Y., 2010. Is sabin-feldman dye test using T. Gondii tachyzoites from animal inoculation still the best method for detecting toxoplasma gondii antibodies? Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 41, 1059–1064.

151. Velmurugan, G. V., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Genotyping studies of Toxoplasma gondii isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. Vet. Parasitol. 155, 314–318. doi:10.1016/j.vetpar.2008.04.021

152. Vigne, J.-D., Guilaine, J., Debue, K., Haye, L., Gérard, P., 2004. Early Taming of the Cat in Cyprus. Science (80-.). 304, 259.

153. Webster, J.P., 2007. The effect of Toxoplasma gondii on animal behavior: Playing cat and mouse. Schizophr. Bull. 33, 752–756. doi:10.1093/schbul/sbl073

154. Weiss, L.M., Kim, K., 2014a. Toxoplasama gondii, the model apicomplexan-perspectives and methods, Second edi. ed.

155. Weiss, L.M., Kim, K., 2014b. Toxoplasma Gondii : The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods.

156. Wilson, R.J., Williamson, D.H., 1997. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 1–16.

157. Wolf, A., Cowen, D., Paige, B., 1939. HUMAN TOXOPLASMOSIS: OCCURRENCE IN INFANTS AS AN ENCEPHALOMYELITIS VERIFICATION BY TRANSMISSION TO ANIMALS. Science (80-.). 89, 226–7.

158. Wyler, D.J., 1990. Modern parasite biology: Cellular, immunological and molecular aspects.

159. Yai, L.E.O., Soares, R.M., Freire, R.L., Richtzenhain, L.J., 2003. Evaluation of experimental Toxoplasma gondii (Nicolle and Manceaux , 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction Avaliação da infecção experimental por Toxoplasma gondii (Nicolle e Manceuax , 1909) em suínos pelas provas. Brazilian J. Vet. 227–234.

160. Yamamoto, J.H., Vallochi, A.L., Silveira, C., Filho, J.K., Nussenblatt, R.B., Cunha-Neto, E., Gazzinelli, R.T., Belfort, R., Rizzo, L.V., 2000. Discrimination between Patients with Acquired Toxoplasmosis and Congenital Toxoplasmosis on the Basis of the Immune Response to Parasite Antigens. J. Infect. Dis. 181, 2018–2022. doi:10.1086/315494

161. Zhu, C., Cui, L., Zhang, L., 2012. Comparison of a Commercial ELISA with the Modified Agglutination Test for Detection of Toxoplasma gondii Antibodies in Sera of Naturally Infected Dogs and Cats. Iran. J. Parasitol. 7, 89–95.

Annexes

Annexe 1

Centre Hospitalier Universitaire de Reims

Secteur : Parasitologie -Mycologie

MAT (ADHS)

DATE :

NOM :

		6	10	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	
	N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A														
B														
C														
D														
E														
F														
G														
H														

Annexe 2

August 2011

EZ1® DNA Tissue Handbook

EZ1 DNA Tissue Kit

For automated purification of DNA from tissue and other samples using EZ1 instruments

QIAGEN®

Sample & Assay Technologies

Annexe 3

Version 1 February 2007

BioRobot® EZ1 DSP Workstation User Manual

IVD

CE

REF 9001360

HB 1037181

QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden

E1

QIAGEN®

Sample & Assay Technologies

Annexe 4

N° Prélèvement	Age	Sexe	ADHS Dilution TOXO	ADHS Titre TOXO
1	5 - 10 ans	F	0	0
2	5 - 10 ans	M	6400	3200
3	3 - 5 ans	M	0	0
4	3 - 5 ans	M	0	0
5	3 - 5 ans	M	800	400
6	3 - 5 ans	F	100	50
7	3 - 5 ans	M	12800	6400
8	5 - 10 ans	M	0	0
9	1 - 2 ans	M	200	100
10	1 - 2 ans	M	6400	3200
11	1 - 2 ans	M	0	0
12	3 - 5 ans	M	12800	6400
13	1 - 2 ans	M	0	0
14	3 ans	M	0	0
15	< à 6 mois	F	0	0
16	1 an	M	800	400
17	1 an	F	400	200
18	6 mois	F	0	0
19	3 ans	F	0	0
20	6 mois	M	0	0
21	6 mois	F	0	0
22	6 mois	M	0	0
23	< à 6 mois	F	0	0
24	< à 6 mois	M	0	0
25	1 an	F	800	400
26	6 mois	M	0	0
27	6 mois	M	0	0
28	1 an	M	0	0
29	6 mois	F	6400	3200
30	2 ans	F	1600	800
31	< à 6 mois	M	6	3
32	2 ans	F	0	0
33	< à 6 mois	M	0	0
34	< à 6 mois	M	6	3
35	1 an	F	0	0
36	< à 6 mois	M	0	0
37	< à 6 mois	F	0	0
38	1an	F	0	0
39	2 ans	M	0	0
40	1an	F	10	6
41	6 mois	M	0	0

42	6 mois	M	0	0
43	2 ans	F	200	100
44	3 ans	M	6400	3200
45	1 an	F	12800	6400
46	1an	F	0	0
47	6 mois	M	25	10
48	6 mois	M	0	0
49	6 mois	F	0	0
50	< à 6 mois	F	0	0
51	1an	M	3200	1600
52	10 ans- 15 ans	M	12800	6400
53	3 ans	M	0	0
54	1an	F	25000	12800
55	1an	F	3200	1600
56	6 mois	M	0	0
57	6 mois	F	0	0
58	3 - 5 ans	M	6400	3200
59	3 ans	M	12800	6400
60	1 an	F	0	0
61	2 - 3 ans	F	3200	1600
62	2 ans	M	50	25
63	2 ans	M	25	10
64	2 ans	F	50	25
65	> à 5 ans	F	6400	3200
66	1an	M	6	3
67	1an	M	10	6
68	1 - 2 ans	F	0	0
69	2 ans	M	800	400
70	6 mois	M	0	0
71	1an	M	12800	6400
72	10 ans- 15 ans	M	12800	6400
73	10 ans- 15 ans	F	1600	800
74	3 ans	M	25	10
75	10 ans- 15 ans	M	3200	1600
76	> à 3 ans	M	0	0
77	> à 3 ans	M	200	100
78	2 - 3 ans	M	3200	1600
79	6 mois- 1an	M	0	0
80	2 ans	M	50	25
81	2ans	F	100	50

82	1 an	M	0	0
83	3 ans	M	0	0
84	10 ans- 15 ans	M	25000	12800
85	1 an	F	25	10
86	3 ans	M	3200	1600
87	2 ans	M	12800	6400
88	1an	M	0	0
89	2 -3 ans	M	6	3
90	1 an	M	0	0
91	2ans	M	10	6
92	1an	M	800	400
93	2ans	F	6400	3200
94	10 ans- 15 ans	M	0	0
95	2- 3 ans	M	400	200
96	2- 3 ans	M	800	400

Annexe 5

N°	Age	Sex	ADHS Dilution Toxo	ADHS Titer TOXO	qPCR (heart)			qPCR (spleen)			qPCR (tongue)		
					Ct	Ct	Ct mean	Ct	Ct	Ct mean	Ct	Ct	Ct mean
CHAT 1	5 - 10 ans	F	0	0	33,78	32,95	33,37	/	/	/	/	/	/
CHAT 2	5 - 10 ans	M	6400	3200	26,85	26,27	26,56	N/A	N/A	N/A	29,74	29,84	29,79
CHAT 3	3 - 5 ans	M	0	0	35,03	33,98	34,51	/	/	/	/	/	/
CHAT 4	3 - 5 ans	M	0	0	32,40	32,84	32,62	/	/	/	/	/	/
CHAT 5	3 - 5 ans	M	800	400	33,16	34,65	33,91	35,68	36,25	35,965	37,07	36,11	36,59
CHAT 6	3 - 5 ans	F	100	50	37,04	36,74	36,89	N/A	N/A	N/A	35,28	N/A	/
CHAT 7	3 - 5 ans	M	12800	6400	20,91	20,78	20,85	36,47	37,4	36,935	N/A	N/A	N/A
CHAT 8	5 - 10 ans	M	0	0	37,12	N/A	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 9	1 - 2 ans	M	200	100	28,24	28,24	28,24	37,29	36,93	37,11	34,11	34,79	34,45
CHAT 10	1 - 2 ans	M	6400	3200	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	32,16	31,7	31,93
CHAT 11	1 - 2 ans	M	0	0	32,13	31,63	31,88	/	/	/	/	/	/
CHAT 12	3 - 5 ans	M	12800	6400	28,70	27,76	28,23	N/A	N/A	N/A	31,78	32,2	31,99
CHAT 13	1 - 2 ans	M	0	0	N/A	36,09	36,09	/	/	/	/	/	/
CHAT 14	3 ans	M	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 15	< à 6 mois	F	0	0	34,72	35,27	35,00	/	/	/	/	/	/
CHAT 16	1 an	M	800	400	29,08	30,45	29,77	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 17	1 an	F	400	200	31,75	32,04	31,90	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 18	6 mois	F	0	0	34,71	34,87	34,79	/	/	/	/	/	/
CHAT 19	3 ans	F	0	0	N/A	N/A	N/A	/	/	/	/	/	/
CHAT 20	6 mois	M	0	0	40,60	37,42	39,01	/	/	/	/	/	/
CHAT 21	6 mois	F	0	0	29,35	29,77	29,56	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 22	6 mois	M	0	0	36,95	35,94	36,45	/	/	/	/	/	/
CHAT 23	< à 6 mois	F	0	0	31,56	31,27	31,42	/	/	/	/	/	/
CHAT 24	< à 6 mois	M	0	0	N/A	36,91	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 25	1 an	F	800	400	31,88	34,95	33,42	39,8	38,8	39,3	35,12	36,4	35,76
CHAT 26	6 mois	M	0	0	32,83	32,05	32,44	/	/	/	/	/	/
CHAT 27	6 mois	M	0	0	31,57	31,77	31,67	/	/	/	/	/	/
CHAT 28	1 an	M	0	0	35,90	N/A	/	/	/	/	/	/	/

CHAT 29	6 mois	F	6400	3200	32,04	31,35	31,70	36,12	N/A	/	N/A	N/A	N/A
CHAT 30	2 ans	F	1600	800	31,77	30,56	31,17	36,89	N/A	/	32,61	34,11	33,36
CHAT 31	< à 6 mois	M	6	3	35,76	35,25	35,51	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 32	2 ans	F	0	0	35,77	36,31	36,04	/	/	/	/	/	/
CHAT 33	< à 6 mois	M	0	0	N/A	35,44	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 34	< à 6 mois	M	6	3	35,71	35,26	35,49	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 35	1 an	F	0	0	N/A	N/A	N/A	/	/	/	/	/	/
CHAT 36	< à 6 mois	M	0	0	34,74	N/A	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 37	< à 6 mois	F	0	0	N/A	N/A	N/A	/	/	/	/	/	/
CHAT 38	1an	F	0	0	35,49	33,94	34,72	/	/	/	/	/	/
CHAT 39	2 ans	M	0	0	33,95	33,27	33,61	/	/	/	/	/	/
CHAT 40	1an	F	10	6	34,83	36,00	35,42	36,47	N/A	/	N/A	N/A	N/A
CHAT 41	6 mois	M	0	0	36,44	34,90	35,67	/	/	/	/	/	/
CHAT 42	6 mois	M	0	0	30,73	30,70	30,72	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 43	2 ans	F	200	100	28,71	28,53	28,62	32,04	N/A	/	N/A	N/A	N/A
CHAT 44	3 ans	M	6400	3200	26,01	25,77	25,89	35,78	35,3	35,54	28,77	28,84	28,81
CHAT 45	1 an	F	12800	6400	28,67	29,14	28,91	/	/	/	32,45	32,3	32,38
CHAT 46	1an	F	0	0	33,34	34,07	33,71	/	/	/	/	/	/
CHAT 47	6 mois	M	25	10	33,89	34,45	34,17	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 48	6 mois	M	0	0	35,80	35,09	35,45	/	/	/	/	/	/
CHAT 49	6 mois	F	0	0	34,94	36,53	35,74	/	/	/	/	/	/
CHAT 50	< à 6 mois	F	0	0	32,52	32,95	32,74	/	/	/	/	/	/
CHAT 51	1an	M	3200	1600	N/A	40,63	/	35,81	37,49	36,65	N/A	N/A	N/A
CHAT 52	10 ans- 15 ans	M	12800	6400	26,67	25,85	26,26	N/A	N/A	N/A	35,4	34,04	34,72
CHAT 53	3 ans	M	0	0	N/A	36,63	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 54	1an	F	25000	12800	31,23	32,97	32,10	35,81	34,7	35,255	28,66	28,77	28,72
CHAT 55	1an	F	3200	1600	37,98	37,02	37,50	36,69	N/A	/	34,81	N/A	/
CHAT 56	6 mois	M	0	0	N/A	N/A	N/A	/	/	/	/	/	/
CHAT 57	6 mois	F	0	0	34,75	35,71	35,23	/	/	/	/	/	/
CHAT 58	3 - 5 ans	M	6400	3200	28,29	28,19	28,24	N/A	N/A	N/A	29,79	30,29	30,04
CHAT 59	3 ans	M	12800	6400	28,42	27,74	28,08	N/A	N/A	N/A	31,21	29,51	30,36
CHAT 60	1 an	F	0	0	33,54	36,43	34,99	/	/	/	/	/	/

CHAT 61	3ans	F	3200	1600	31,12	30,92	31,02	36,15	N/A	/	35,76	N/A	/
CHAT 62	2 ans	M	50	25	30,13	31,53	30,83	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 63	2 ans	M	25	10	36,69	40,03	38,36	N/A	N/A	N/A	33,05	33,31	33,18
CHAT 64	2 ans	F	50	25	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	37,95	N/A	/
CHAT 65	> à 5 ans	F	6400	3200	N/A	34,60	34,60	39,98	N/A	/	31,98	32,27	32,13
CHAT 66	1an	M	6	3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 67	1an	M	10	6	31,80	31,21	31,51	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 68	1 - 2 ans	F	0	0	N/A	37,21	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 69	2 ans	M	800	400	34,93	37,24	36,09	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 70	6 mois	M	0	0	32,12	29,00	30,56	/	/	/	/	/	/
CHAT 71	1an	M	12800	6400	26,71	26,69	26,70	30,54	31,14	30,84	33,51	32,66	33,09
CHAT 72	10 ans- 15 ans	M	12800	6400	26,04	26,39	26,22	N/A	N/A	N/A	26,64	25,53	26,09
CHAT 73	10 ans- 15 ans	F	1600	800	34,17	34,05	34,11	N/A	N/A	N/A	33,49	36,45	34,97
CHAT 74	3 ans	M	25	10	40,52	33,35	36,94	N/A	N/A	N/A	35,3	N/A	/
CHAT 75	10 ans- 15 ans	M	3200	1600	28,98	28,86	28,92	N/A	N/A	N/A	40,57	34,04	37,31
CHAT 76	5 ans	M	0	0	37,40	34,81	36,11	/	/	/	/	/	/
CHAT 77	5 ans	M	200	100	30,87	30,98	30,93	N/A	N/A	N/A	35,26	36,39	35,83
CHAT 78	3 ans	M	3200	1600	25,85	25,81	25,83	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 79	6 mois	M	0	0	32,73	32,51	32,62	/	/	/	/	/	/
CHAT 80	2 ans	M	50	25	34,19	34,68	34,44	37,15	N/A	/	34,6	34,66	34,63
CHAT 81	2ans	F	100	50	27,02	27,24	27,13	36,01	37,80	36,91	37,7	36,12	36,91
CHAT 82	1 an	M	0	0	34,35	35,28	34,82	/	/	/	/	/	/
CHAT 83	3 ans	M	0	0	N/A	N/A	N/A	/	/	/	/	/	/
CHAT 84	10 ans- 15 ans	M	25000	12800	27,04	26,31	26,68	N/A	N/A	N/A	36,86	34,7	35,78
CHAT 85	1 an	F	25	10	32,35	36,94	34,65	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 86	3 ans	M	3200	1600	23,24	23,34	23,29	35	35,32	35,16	32,15	31,47	31,81
CHAT 87	2 ans	M	128020	6400	30,46	29,48	29,97	N/A	N/A	38,41	N/A	N/A	N/A
CHAT 88	1an	M	0	0	33,84	34,54	34,19	/	/	/	/	/	/
CHAT 89	3 ans	M	6	3	30,00	31,83	30,92	36,38	37,13	36,76	36,79	37,32	37,06
CHAT 90	1 an	M	0	0	37,96	N/A	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 91	2ans	M	10	6	34,80	34,09	34,45	37,87	N/A	/	38,78	34,68	36,73
CHAT 92	1an	M	800	400	32,73	32,79	32,76	33,73	34,09	33,91	N/A	N/A	N/A

CHAT 93	2ans	F	6400	3200	25,39	25,99	25,69	36,22	N/A	/	30,08	30,43	30,26
CHAT 94	10 ans- 15 ans	M	0	0	N/A	35,31	/	/	/	/	/	/	/
CHAT 95	3 ans	M	400	200	29,08	28,14	28,61	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHAT 96	3 ans	M	800	400	29,16	30,64	29,90	N/A	N/A	N/A	/	/	/
CHAT 97	5 ans	M			30,55	30,75	30,65	42,3	37,33	39,82	N/A	N/A	N/A

Veterinary Parasitology 239 (2017) 31–36

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Research paper

First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria

Feriel Yekkour[a,b,*], Dominique Aubert[c], Aurélien Mercier[d], Jean-Benjamin Murat[d,e], Mammar Khames[a,b], Paul Nguewa[f], Khatima Ait-Oudhia[b], Isabelle Villena[c], Zahida Bouchene[g,**]

[a] University of Medea, School of Sciences, Department of Biology, Medea, Algeria
[b] National Veterinary High School, Algiers, Algeria
[c] National Reference Centre for Toxoplasmosis, Biological Resource Center for Toxoplasma, Centre Hospitalier Universitaire de Reims and EA3800, SFR CAP-Santé, University Reims Champagne-Ardenne, Reims, France
[d] INSERM, UMR_S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Université de Limoges, Limoges, France
[e] National Reference Centre for Toxoplasmosis, Biological Resource Center for Toxoplasma, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France
[f] Institute of Tropical Health (ISTUN) and Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, Pamplona, Spain
[g] University Hospital of Beni Messous, School of Medicine, Algiers, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:
Toxoplasma gondii
Stray cats
Modified agglutination test
Real-time PCR
Microsatellite genotyping
Algeria

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease with worldwide distribution and a major public health problem. In Algeria, no data are currently available about genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from animals or humans. The present study assesses for the first time the seroprevalence of toxoplasmosis in stray cats, and provides molecular characterization of *T. gondii* strains circulating in this feline population in Algiers, the capital city of Algeria. Sera from 96 stray cats were tested for the presence of antibodies against *T. gondii* using the modified agglutination test. The seroprevalence was 50% (48/96) using 1:6 as the positivity cut-off. Different organs samples from stray cats, including heart samples, were tested for the presence of *Toxoplasma* DNA using real-time PCR. *T. Gondii* DNA was detected in 90.6% (87/96) of hearts. Of these parasitic DNAs, 22 were submitted to genotyping through the analysis of 15 microsatellite markers. The identified genotypes (12 of 22) mainly belonged to the type II lineage.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is one of the most frequent protozoan parasites that infect mammals and birds worldwide. One third of the human population worldwide is considered as chronically infected (Weiss and Kim, 2014). It has been recognized as an important food-and water-borne pathogen in humans, sometimes leading to outbreaks of acute infections (Ajzenberg et al., 2010; Carme et al., 2009). Felids play a key role in the transmission of *T. gondii* to humans and other animals, through excretion of environmentally resistant oocysts in their feces (Dubey, 2010). Humans become infected with *T. gondii* by eating undercooked infected meat or by ingestion of food or water contaminated with oocysts shed by felids (Dubey et al., 2009). Although *T. gondii* infections are generally asymptomatic, however toxoplasmosis can be severe in humans in some situations (in pregnant women possible leading to congenital toxoplasmosis and in immunocompromised patients). Moreover *Toxoplasma* is a major cause of abortion in sheep and goats (Tenter et al., 2000). For these reasons, toxoplasmosis is considered as a major human and animal public health issue. Global seroprevalence of toxoplasmosis is continuingly evolving, subject to regional socioeconomic parameters and population habits (Pappas et al., 2009). Recent general population data in some countries of North Africa showed prevalence rates around 50% (Bouratbine et al., 2001; El Mansouri et al., 2007; El Deeb et al., 2012; Hammond-Aryee et al., 2014; Messerer et al., 2014; Gashout et al., 2016). The distribution of *T. gondii* genotypes also varies across the continents (Ajzenberg et al., 2004; Lehmann et al., 2006; Dubey et al., 2007). In Europe and North America, the population structure of *T. gondii* mainly consists of three distinct clonal lineages known as types I, II and III (Sibley and Boothroyd, 1992). Type II is largely predominant in Europe, from the extreme north (the Artic archipelago of Svalbard, Finland) (Prestrud et al., 2008) to the Mediterranean countries (Italy, Portugal, Greece). This observation has been confirmed in France in humans (Ajzenberg et al., 2002), as well as in domestic (Dumètre et al., 2006) or in wild animals (Aubert et al., 2010). However, little is known about the distribution of *T. gondi* genotypes in Africa, and even less concerning genotypes circulating in animals or humans in Algeria.The aim of the present study was to provide epidemiological data about *T. gondii* from

* Corresponding author at: University of Medea, School of Sciences, Department of Biology, Medea, Algeria.
** Corresponding author.
E-mail addresses: ferielyekkour@yahoo.fr (F. Yekkour), bouchene_z@hotmail.com (Z. Bouchene).

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.013
Received 15 December 2016; Received in revised form 3 April 2017; Accepted 11 April 2017
0304-4017/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Algeria. Here, we report for the first time seroprevalence data in stray cats *Felis silvestris catus* and the molecular characterization of *T. gondii* strains circulating in this cat population from the capital city Algiers in Algeria.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

In the context of the National Program for Rabies Control, *Hygiène Urbaine d'Alger* (HURBAL) captured stray cats and dogs from Algiers area; all cats captured in this context were stray domestic animals, there were no feral cats. This program is carried out by HURBAL, which is an institution trust of the Algerian Ministry of Interior, the Local Government and the Algerian Ministry of Agriculture and Rural Development. Two additional veterinarians were responsible for ensuring the good health of the animals that were caught. Cats were caught carefully with sheathed clamp. Once captured, the animals were housed in cages regularly cleaned and disinfected. They were euthanized only after expiration of the legal delay of guard (owners had seven days to claim their animal). The authors of the paper were not involved in this program, but took the opportunity to collect precious samples from these definitive hosts.

2.2. Samples

Samples were collected during the month of July and August 2015. Blood and organs samples (heart, spleen and tongue) were collected from 96 stray cats (63 males and 33 females) living in the city of Algiers (Algeria), located the north-central portion of Algeria (latitude 36° 42′ 00″ N, longitude 3° 13′ 00″ E). Sampling was performed in a room dedicated to veterinarian activities. Organ samples were taken immediately after euthanasia of the animals.

The approximate age of each cat was estimated based on dentition. Cats were classified as juveniles (< 1year), sub-adults (1year-2 years), and adults (> 2 years) (García-Bocanegra et al., 2010). Sex was also recorded for each animal. The sera were separated from the blood clot by centrifugation for 10 min at 1900 *g* and stored with heart, spleen and tongue samples at −20 °C until analysis. All samples were later processed at the French National Reference Centers for Toxoplasmosis: in Reims for serological examinations and DNA extraction and in Limoges for genotype analyses.

2.3. Serological examination

Sera samples were defrosted and tested for the presence of *T. gondii* specific IgG antibodies with the modified agglutination test (MAT) as previously described (Dubey and Desmonts, 1987). Whole formalin-fixed RH strain tachyzoites were used as antigen. Sera from cats were tested using dilutions ranging from 1:6 to 1:12800. A positive reaction was observed when agglutination of tachyzoites formed a mat covering about half of the well base. The 1:6 dilution was chosen as the positivity cut-off.

2.4. Molecular methods

2.4.1. DNA extraction

After defrosting, whole hearts from each cat were analyzed, as well as spleen and tongue from serologically positive cats. For analysis, organs were blended, homogenized and incubated at 37 °C for 90 min in a trypsin solution (T4674 SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, France) (final concentration 0.25%). The suspension was then filtered, and centrifuged at 1900 g during 10 min. The pellet was washed three times by resuspension in saline solution, centrifuged again, and 300 µl of homogenate were stored at −80 °C until DNA extraction.

DNA extraction was performed with theEZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. As recommended: 10 µl of proteinase K solution and 190 µl buffer G2 were added to the 300 µl of homogenized sample from each heart, spleen, tongue and incubated at 56 °C for 90 min or more until complete lysis. Two thousand microliters of lysed sample were transferred in a new 2 ml sample tube DNA. Extraction and purification steps were then performed by a BioRobot EZ1 (Qiagen). Finally, the DNA was eluted in 100 µl and stored at −80 °C until further use.

2.4.2. Quantitative real-time PCR (qPCR)

DNAs extracted from the hearts, spleen and tongue samples were tested by quantitative real-time PCR with a labeled probe on a thermocycler (Bio-Rad iQ5) (Foster city, California, USA) targeting the *T. gondii* 529 bp repeat element AF146527 (De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012). The forward and reverse sequences primers were 5′-CGGAGAGGGAGAAGATGTT-3′, and 5′-GCCATCACCACGAGGAAA-3′, respectively. The probe used was 5′-FAM-CTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGG-BHQ1-3′ (De Craeye et al., 2011; Meerburg et al., 2012). Each PCR reaction contained 10 µl of extracted DNA, mixed with 15 µl of a PCR mix containing 12.5 µl of platinum UDG (Platinum supermix UDG®, Invitrogen, Paisley, UK), at a concentration of 3 mM MgCl2, 0.5 µl of each primer at a concentration of 20 µM, 0.5 µl labeled probe at a concentration of 2 µM.

DNA extracted from cultured tachyzoites (RH strain) was used as a positive control. The cycling protocol was as follows: initial decontamination by UDG at 50 °C for 2 min and denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Results were analyzed with the iCycler software.

2.4.3. Genotyping analysis

T. gondii DNA samples of hearts with a quantification cycle (Cq) value < 30 by qPCR were submitted to genotyping analysis using15 microsatellite (MS) markers (*TUB2*, *W35*, *TgM-A*, *B18*, *B17, M33, IV.1,XI.1,M48*, *M102*, *N60*, *N82*, *AA*, *N61*, and *N83*) in a multiplex PCR assay previously described (Ajzenberg et al., 2010). During the analysis, in addition to our new DNA samples, several reference strains were analyzed in parallel: reference strains for Type I (TgA00004 = G-T1), Type II (Me49), and Type III (CTG) and another reference strain originating from Africa [Africa 1 strain (TgA15004 = GAB2-2007-GAL-DOM2)] (Dubey, 1992; Lunde and Jacobs, 1983; Mercier et al., 2010; Pfefferkorn et al., 1977; Su et al., 2012). Briefly, in each pair of primers, the forward one was 5′-end labeled with fluorescein to allow sizing of PCR products electrophoresed in an automatic sequencer. PCR was carried out in a 25 µl reaction mixture consisting of 12.5 µl of 2 x QIAGENMultiplex PCR Master Mix (Qiagen, France), 5 pmol of each primer and 5 µl of DNA. Cycling conditions were: 15 min at 95 °C (initial denaturation); 30 s at 94 °C, 3 min at 61 °C, and 30 s at 72 °C (35 cycles); and 30 min at 60 °C (final elongation). One microliter of each PCR product was directly mixed with 0.5 µl of a dye-labeled size standard (ROX 500, Applied Biosystems) and 23.5 µl of deionized formamide. This mixture was denatured at 95 °C for 5 min and then electrophoresed using an automated sequencer (ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems). The sizes of the alleles in base pairs (bp) were estimated using Gene Mapper analysis software (version 4.0, Applied Biosystems).

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 19.0. The statistical significance between seroprevalence and age or sex was evaluated by the χ^2 test. These analyses were considered significant when $p < 0.05$. The confidence intervals (95%) were calculated according to the method described by Toma (Toma et al., 1996). The agreement between qualitative results obtained from serological tests and qPCR was evaluated by calculating the Cohen's kappa. Agreement with kappa values of 0.00–0.20 was considered slight, 0.21–0.40 fair,

Table 1
Seroprevalence of *T. gondii* antibodies according to sex and age of stray cats. No difference was observed according to gender, but seroprevalence was significantly less frequent in juveniles than in older cats.

category	No.examined	No.of positive results	P (χ^2)	CI 95%[a]
Sex				
Female	33	17 (51.5%)	0.8	36–66
Male	63	31 (49.2%)		38–60
Age(year)				
< 1 (juveniles)	25	2 (8.0%)		1–15
1–2 (sub-adults)	40	25 (62.5%)	< 0.005	49–75
> 2 (adults)	31	21 (67.7%)		52–82

[a] Confidence interval at 95%.

0.41–0.60 moderate, 0.61–0.80 substantial, and 0.81–1.00 almost perfect (Landis and Koch, 1977).

3. Results

3.1. Serological tests

Sera samples (n = 96) were tested for the presence of *T. gondii* specific IgG with the modified agglutination test (MAT), using 1:6 as the positivity cut-off. Antibodies against *T. gondii* were found in 48 of 96 (50%) cats (CI = 40%-60%), with titers between 6 and 12800. The majority of titers (31/48) were high, ranging from 400 to 6400.

Antibodies against *T. gondii* were found in 31 of 63 (49.2%) males and 17 of 33 (51.5%) females. No statistically significant difference was observed between the prevalence of infection and the gender of the cat (p = 0.8). Antibodies to *T. gondii* were also found in 2 of 25 juvenile (< 1 year-old) cats, in 25 of 40 sub-adult (1year-2 years old) cats and in 21of 31adult (> 2 years-old) cats. The differences among age categories were significant (p < 0.005) (Table 1).

3.2. Molecular detection and identification

3.2.1. qPCR

Globally, 87 of the 96 hearts (90.6%) collected and tested by qPCR were found positive for *T. gondii*, with Cq values ranging from 20.8 to 39.0 (data not shown). With respect to the 63 males sampled, we found that 58 heart samples (92.1%) were positive by qPCR, whereas among the 33 females, 29 heart samples (87.9%) were found positive. Statistically, no significant difference was found between the qPCR results obtained and the gender of the cat.

Out of the 96 hearts tested, 22 (22.9%) exhibited a Cq inferior to 30, 65 (67.7%) exhibited a Cq superior or equal to 30 and 9 (9.4%) were found negative for *Toxoplasma* DNA presence.

In the group of Cq < 30, 21 of 22 (95.45%) sera samples were also found positive (MAT ≥ 6). On the opposite, 25 of 65 (30.8%) samples were found seropositive among the group of samples with Cq ≥ 30. Finally, in the group of samples negative with the qPCR, two of 9 (22.2%) sera samples were unexpectedly found seropositive (Table 2).

In the 48 seropositive cats, 46 hearts (95.8%), 22 spleens (41.7%) and 31 tongues (64.5%) were found positive by qPCR (data not shown).

3.2.2. Agreement between serological tests and molecular detection

The general agreement between qualitative results of serological tests (positive or negative) and qualitative results of qPCR (amplification or no amplification) was slight, reaching 55.2%, with a Cohen's kappa value of 0.104 (p = 0.04). When considering samples with no amplification together with samples with late amplification (Cq > 30) vs samples with early amplification (Cq < 30), the general agreement with serological tests reached 70.8% (moderate agreement) with a Cohen's kappa value of 0.417 (p < 0.01).

Table 2
Comparison of Real-time PCR versus MAT serological results.

	No. of samples with			
	Cq[a] < 30	Cq ≥ 30	Cq = NA[b]	Total
No. of seropositive samples (MAT ≥ 6) (%)	21 (95.45%)	25(38.5%)	2(22.2%)	48
No. of seronegative samples (MAT < 6) (%)	1 (4.55%)	40(61.5%)	7(77.8%)	48
Total	22	65	9	96

[a] Quantification cycle of heart samples.
[b] NA: not amplified.

3.2.3. Genotyping

Out of the 87 qPCR positive heart samples, 22 (22.9%) had a Cq < 30 (Table 2) and were sent to the National Reference Center for toxoplasmosis (Limoges, France) for genotyping analyses (Table 3).

In total, we were able to amplify and determine the *T. gondii* genotypes of 12 DNA samples (54.5%) on at least 5 MS markers (2 samples were successfully amplified for all the 15 MS markers). Ten DNA samples (45.4%) did not allow genotyping: 7 were not amplified at all, while 3 had only 1–4 markers amplified, which makes the method not discriminant enough and induces a high risk of confusion between types.

All the 12 genotyped DNAs were characterized as type II. One of them was identified as type II variant (with a specific allele for W35).

4. Discussion

The first aim of the present study was to determine toxoplasmosis seroprevalence in a stray cat population in the capital city of Algeria. Determining toxoplasmosis seroprevalence in stray cats is a way to explore the potential risk of human infection brought by these animals.

In the present study, toxoplasmosis seroprevalence in stray cats from Algeria (63 males, 33 females) was determined for the first time. Using the modified agglutination test (MAT) with a cut-off at 1:6, the seropositivity rate in stray cats was 50%. The MAT was chosen for its high sensitivity and appeared to be specific for *T. gondii* and especially in cat populations (Dubey and Thulliez, 1989; Dubey et al., 1995; Dorny et al., 2002; Al-Kappany et al., 2010). Human toxoplasmosis seroprevalence was previously estimated in Algeria around 50% (Messerer et al., 2014). These data confirm a high level of *T. gondii* circulation in Algeria for which cats play an important role. Therefore cats may maintain at a high degree the risk of human toxoplasmosis in this area by contaminating the environment with oocysts. Moreover, our study was carried out in stray cats in an urban environment. These stray animals, because of their hunting habits, are at a higher risk of infection than domestic cats normally fed on commercial and healthy food (Dorny et al., 2002). Taking together all the aforementioned data, these factors may explain the relatively high seroprevalence (50%) found in our study despite the unfavorable climatic conditions (hot and dry) in this region for the survival of oocysts (Rifaat et al., 1975).

No significant difference was observed between prevalence of infection and gender of cat, suggesting that they are equally susceptible to *T. gondii* infection. Similar findings were obtained by other authors (Bolais et al., 2017; Haddadzadeh et al., 2006; Pena et al., 2006; Salant and Spira, 2004; Spada et al., 2012). Nonetheless, some studies have found significantly higher seroprevalence in male strays compared to females (Miro et al., 2004). This observation can be explained considering the territorial habits, as males have a wider area of operation than females. On the contrary, Besné-Mérida et al. (2008) reported an opposite observation, females cats being more frequently infected than males (Besné-Mérida et al., 2008).

The present study shows a progressive increase in prevalence with age, being lowest in cats below one year followed by those between 1

Table 3
Multilocus microsatellite (MS) genotyping of *T. gondii* DNAs extracted from hearts of stray cats (*Felis silvestris catus*) in Algiers (Northern Algeria). All the samples that were successfully genotyped were grouped in Type II. One sample was a W35 variant-type II. Three samples with 1–4 markers amplified could not be reliably genotyped (threshold of reliability: 5 MS). Seven DNA samples (45.4%) were not amplified at all, and are not depicted.

N° of DNA isolates from heart samples	Age (years)	Cq of heart samples[a]	MS-Type[b]	*TUB2*	*W35*	*TgM-A*	*B18*	*B17*	M33	MIV.1	MXI.1	*M48*	*M102*	*N60*	*N82*	*AA*	*N61*	*N83*
GT1			I	291	248	209	160	342	169	274	358	209	168	145	119	265	087	306
Me49			II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	091	310
CTG			III	289	242	205	160	336	165	278	356	215	190	147	111	269	089	312
TgA15004			Africa I	291	242	207	160	342	165	278	354	223	166	142	111	277	097	310
DZ-Cat02	5–10	26.56	II (14/15)	NA	242	207	158	336	169	274	356	211	178	140	109	279	109	310
DZ-Cat07	3–5	20.84	II (15/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	217	178	142	125	273	115	310
DZ-Cat09	1–2	28.24	ND(4/15)	NA	244	NA	NA	NA	NA	274	NA	NA	176	140	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat12	3–5	28.23	II (8/15)	289	242	207	NA	NA	169	NA	356	NA	NA	145	111	NA	085	NA
DZ-Cat43	2	28.62	ND (3/15)	NA	NA	NA	NA	NA	169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	267	NA	308
DZ-Cat44	3	25.89	II (14/15)	289	242	207	158	336	169	274	NA	219	174	140	111	277	105	308
DZ-Cat52	10–15	26.26	II (14/15)	289	242	NA	158	336	169	274	356	219	174	140	111	287	095	308
DZ-Cat59	3	28.08	ND (4/15)	289	242	NA	NA	336	NA	NA	NA	NA	NA	140	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat71	1	26.7	II (6/15)	289	242	NA	NA	336	169	NA	356	NA	NA	NA	119	NA	NA	NA
DZ-Cat72	10–15	26.21	II variant W35 (10/15)	289	244	207	158	336	NA	NA	NA	NA	176	140	113	259	NA	310
DZ-Cat78	3	25.83	II (13/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	NA	184	140	109	NA	101	310
DZ-Cat84	10–15	26.67	II (10/15)	289	NA	207	NA	336	169	274	356	NA	174	140	111	NA	NA	314
DZ-Cat86	3	23.29	II (15/15)	289	242	207	158	336	169	274	356	219	174	140	113	259	105	312
DZ-Cat93	2	25.69	II (7/15)	289	242	207	158	336	169	274	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DZ-Cat95	3	28.61	II (8/15)	289	242	207	NA	NA	169	NA	NA	NA	176	140	109	NA	NA	310

ND: genotype of strain not determined.
NA: sequence not amplified.
[a] Quantification cycle of heart samples.
[b] Type of strains genotyped using multilocus microsatellite (number of MS amplified/number of MS tested).

and 2 years and highest in cats above two years old, probably because adult cats have more exposure to *T. gondii* in the course of their life. This observation agrees with what is usually reported elsewhere in the literature (Afonsoa et al., 2006; Haddadzadeh et al., 2006; Pena et al., 2006). The molecular survey of *T. gondii* in cats performed by real-time PCR in this study showed that prevalence was 90.6%, independently of sex. This molecular technique appears to be more sensitive than the MAT serology, detecting parasitic DNA in 85% of heart samples that came from seronegative cats. Conversely, more than 95% of samples with Ct < 30 (late amplifications) were also seropositive. Accordingly, the agreement between these two methods increased when negative samples and late amplifications were grouped together. These results suggest that in our study serological assays were not able to detect infected cats with a low parasitic load, which encourages the use of molecular tools when possible, to enhance epidemiological investigations in animals. Indeed, PCR has been described as a sensitive, specific and rapid alternative for detecting *T. gondii* (Hurtado et al., 2001). It can detect the DNA of parasites even when the tissues available for testing are in state of decomposition (Yai et al., 2003). Furthermore, we showed in this study that real-time PCR can be used to detect the parasite in heart, tongue and spleen samples from stray cats. It is worth noting that in our study, *T. gondii* was detected more often in heart samples than in the other organs in seropositive cats. Little is known regarding the tissue distribution of *T. gondii* in cats (Dubey, 2010). Recent studies indicate that *T. gondii* encysts frequently in extraneural tissues of naturally and experimentally infected animals (Al-Kappany et al., 2010). The density of *T. gondii* in the heart is higher. It is also easier to remove heart than brain from cats for bioassays studies (Al-Kappany et al., 2010).

The second aim of the present study was to determine the genetic diversity of *T. gondii* strains circulating in this cat population from Algeria. This is the first report of *T. gondii* genotyping in Algeria. Our results showed a predominance of the clonal lineage Type II strain in cats from Algiers (Algeria). The majority of our samples exactly fit to Type II (11 DNAs) and one was assigned to the Type II variant with the specific allele 244 of the W35 marker (DZ-Cat 72; Table 3). A second DNA sample (DZ-Cat 09) probably belongs to the same genotype (allele 244 at W35 marker) but the lack of markers amplified does not allow us to conclude. Indeed, markers could not be amplified in many DNA samples (12 incomplete genotypes). This lack of completeness in our dataset can be explained by having worked on direct and frozen tissue samples without a prior isolation by bioassay in mice that could amplify the amount of parasite. It was not possible in our study for logistical reasons (difficulty to store organs at 4 °C in the field and absence of level 2 bio safety facilities for maintenance of mice). The fact that the two complete genotypes (15 MS markers amplified) correspond to the two lowest Cq values (2 highest DNA concentrations) and that we observed a trend towards increasing the number of markers amplified when the Cq values are lower than 27, supports these assumptions (Table 3).

Our results show nevertheless that it is still possible to obtain genetic data, even incomplete, from tissues such as the heart with a fairly simple logistics compared to strain isolation in mice. We must nonetheless remain cautious about our results. Hence our decision to consider for typing only the samples amplified with more than 5 markers, for which the allocation for a given type is reliable (here Type II or Type II variant). For samples with less than 5 markers amplified, even if they were Type II alleles, the alternative of recombinant genotypes cannot be excluded. Previous studies have been performed on the genotyping of *T. gondii* isolates from cats in other countries of Northern and Eastern Africa (Al-Kappany et al., 2010). Al-Kappany et al., have genotyped *T. gondii* from Egyptian feral Cats using 10 PCR-RFLP markers on 115 isolates. Their study revealed a majority of Type II strains, which is consistent with ours. One hundred and three isolates belonged to Type II, 42 to Type III and only 8 and 4 respectively to atypical genotypes and mixed infections (Al-Kappany et al., 2010). In another study on thirty three isolates from Ethiopian feral cats, the authors revealed that nine of these isolates belonged to type II, five to type III, ten to type II variant, and nine to toxoDB #20 (Dubey et al., 2013).

The results of the current study support previous findings that the clonal Type II with the clonal Type III lineages seem to predominate in domestic animals from some Africa regions (Lindström et al., 2008; Velmurugan et al., 2008): Algeria, Egypt, Mali, Kenya, and Congo.

These observations could be associated with what we observed in the Arabic peninsula, where Type II and III strains are also prevalent (Al-Kappany et al., 2010; Salant et al., 2009). Quite surprisingly, the clonal Type III strain was absent from our stray cats in Algeria. This may be explained by the small size of the sampling area, or by other unidentified biases in sampling. However, our data show similarities between the population structures of *T. gondii* from around the Mediterranean. These genetic proximities across different Mediterranean areas could be the result of human activities (anthropization) (Mercier et al., 2011) and privileged trade exchanges between these countries (Mercier et al., 2010) since the advent of agriculture in this region 10,000 years ago associated with cat domestication (Vigne et al., 2004). This hypothesis is reinforced by studies that estimated that clonal lineages II and III emerged at that time (Boyle et al., 2006; SU et al., 2003). However, one must remain cautious about these observations because of the small number of isolates studied, on a reduced number of countries explored associated with the diversity of the genetic markers used across studies and sometimes incomplete genotyping, making the comparison uncertain.

Moreover, non-classical genotypes of the parasite associated with a greater genetic diversity were described in other western and central Africa countries from animal and human strains (Ajzenberg et al., 2009; 2004; Mercier et al., 2010). Based on our results, we could conclude that the genotype II of *T. gondii* is predominant in cats from Algiers (Algeria). However, the absence of type III in our study and the recent description of a larger genetic diversity of *Toxoplasma* in some regions of Africa (Ajzenberg et al., 2009, 2004; Mercier et al., 2010) must promote further explorations of *T. gondii* genetic diversity in Algeria. Genetic diversity in Africa is important for elucidating the evolutionary history of *T. gondii* and especially to understand the variety of clinical forms. Several studies argued for a role of genotypes in the clinical expression of toxoplasmosis (Carme et al., 2002; Dardé, 2008; De Salvador-Guillouët et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Gallego et al., 2006; Mercier et al., 2010), and in the case of Africa some features of pathogenicity in human toxoplasmosis seem to emerge (Gilbert et al., 1999; Ronday et al., 1996). Therefore further broader molecular epidemiological studies are required on more isolates genotyped from other regions of Algeria, and more widely across the African continent.

Acknowledgments

We thank R. Geers and E. Dupuis for helpful technical assistance. We are grateful to the veterinarians of HURBAL for their participation in providing samples. We also thank the personal of Bio-Diag (Cerba laboratory) of Hydra (Algiers) for helping us to send the samples to France. We would like to thank Daniel Ajzenberg and Lokman Galal for critical reading of previous versions of the manuscript and helpful discussions. We thank the National Reference Centers for Toxoplasmosis in Reims and Limoges (France) for accepting us to perform this work in their laboratories and faculty of sciences and technology, University of Medea, Medea (Algeria) for funding the stay in France.

References

Afonsoa, E., Thulliez, Philippe, Gilot-Fromont, E., 2006. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (Felis catus). Int. J. Parasitol. 36, 1373–1382.

Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., Dardé, M.-L., 2002. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J. Infect. Dis. 186, 684–689. http://dx.doi.org/10.1086/342663.

Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L., 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 34, 1185–1196. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.007.

Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J., Aubert, D., Franck, J., Bessières, M.-H., Quinio, D., Pelloux, H., Delhaes, L., Desbois, N., Thulliez, P., Robert-Gangneux, F., Kauffmann-Lacroix, C., Pujol, S., Rabodonirina, M., Bougnoux, M.-E., Cuisenier, B., Duhamel, C., Duong, T.H., Filisetti, D., Flori, P., Gay-Andrieu, F., Pratlong, F., Nevez, G., Totet, A., Carme, B., Bonnabau, H., Dardé, M.-L., Villena, I., 2009. Genotype of 88 Toxoplasma gondii isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. J. Infect. Dis. 199, 1155–1167. http://dx.doi.org/10.1086/59747.

Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.L., 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. J. Clin. Microbiol. 48, 4641–4645. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01152-10.

Al-Kappany, Y.M., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Abu-Elwafa, S.A., Hilali, M., Dubey, J.P., 2010. High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: isolation of viable Toxoplasma gondii, tissue distribution, and isolate designation. J. Parasitol. 96, 1115–1118. http://dx.doi.org/10.1645/GE-2554.1.

Aubert, D., Ajzenberg, D., Richomme, C., Gilot-Fromont, E., Terrier, M.E., de Gevigney, C., Game, Y., Maillard, D., Gibert, P., Dardé, M.L., Villena, I., 2010. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. Vet. Parasitol. 171, 346–349.

Besné-Mérida, A., Figueroa-Castillo, J.A., Martínez-Maya, J.J., Luna-Pastén, H., Calderón-Segura, E., Correa, D., 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. Vet. Parasitol. 157, 310–313. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.019.

Bolais, P.F., Vignoles, P., Pereira, P.F., Keim, R., Aroussi, A., Ismail, K., Dardé, M.-L., Amendoeira, M.R., Mercier, A., 2017. Toxoplasma gondii survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. Parasit Vectors 10, 88. http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2017-8.

Bouratbine, A., Siala, E., Chahed, M.K., Aoun, K., R, B.E.N.I., 2001. Profil séro-épidémiologique de la t oxoplasmose au nord de la tunisie 61–66.

Boyle, J.P., Rajasekar, B., Saeij, J.P.J., Ajioka, J.W., Berriman, M., Paulsen, I., Roos, D.S., Sibley, L.D., White, M.W., Boothroyd, J.C., 2006. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 10514–10519. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510319103.

Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, a M., Peneau, C., Dardé, M.L., Demar, M., Neron, P., Darde, M.L., 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in french guiana severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J. Clin. Microbiol. 40, 4037–4044. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037.

Carme, B., Demar, M., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., 2009. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. Emerg. Infect. Dis. 15, 656–658. http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.081306.

Dardé, M.L., 2008. *Toxoplasma gondii*, new genotypes and virulence. Parasite 15, 366–371.

De Craeye, S., Speybroeck, N., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Collinet, F., Tavernier, P., Van Gucht, S., Dorny, P., Dierick, K., 2011. *Toxoplasma gondii* and Neospora caninum in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? Vet. Parasitol. 178, 64–69. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.016.

De Salvador-Guillouët, F., Ajzenberg, D., Chaillou-Opitz, S., Saint-Paul, M., Dunais, B., Dellamonica, P., Marty, P., 2006. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. J. Infect. 53, 47–50.

Dorny, P., Speybroeck, N., Verstraete, S., Baeke, M., De Becker, A., Berkvens, D., Vercruysse, J., 2002. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. Vet. Rec. 115, 626–629.

Dubey, J.P., Desmonts, G., 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Vet. J. 19, 337–339.

Dubey, J.P., Thulliez, P., 1989. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. J. Am. Vet. Med. Assoc. 194, 1297–1299.

Dubey, J.P., Lappin, M.R., Thulliez, P., 1995. Long-Term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. J. Parasitol. 81, 887–893.

Dubey, J.P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C.H., Hill, R., Su, C., 2007. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. Parasitology 134, 1559–1565. http://dx.doi.org/10.1017/S0031182007003083.

Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Rodríguez-Peña, S., Martínez-García, S., González-Herrera, A., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Su, C., 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango. Mexico. J. Parasitol. 95, 319–322. http://dx.doi.org/10.1645/GE-1874.1.

Dubey, J.P., Choudhary, S., Tilahun, G., Tiao, N., Gebreyes, W. a., Zou, X., Su, C., 2013. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. Vet. Parasitol. 196, 206–208. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.015.

Dubey, J., 1992. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. J. Parasitol. 78, 151–153.

Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans, second edi. ed. (Beltsville, Marylan, U.S.A).

Dumètre, A., Ajzenberg, D., Rozette, L., Mercier, A., Dardé, M.L., 2006. Toxoplasma gondii infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. Vet. Parasitol. 142, 376–379. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.005.

El Deeb, H.K., Salah-Eldin, H., Khodeer, S., Allah, A.A., 2012. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in antenatal population in Menoufia governorate. Egypt. Acta Trop. 124, 185–191. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.005.

El Mansouri, B., Rhajaoui, M., Sebti, F., Amarir, F., Laboudi, M., Bchitou, R., Hamad, M., Lyagoubi, M., 2007. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Rabat. Morocco.S ante Publique (Paris). 289–290.

Ferreira, A., de, M., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of

natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. Infect. Genet. Evol. 6, 22–31.
Gallego, C., Saavedra-Matiz, C., Gómez-Marín, J.E., 2006. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). Acta Trop. 97, 161–167.
García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Martínez, F., Vargas, a., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., Almería, S., 2010. Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (Lynx pardinus). Vet. Parasitol. 167, 36–42. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.044.
Gashout, A., Amro, A., Erhuma, M., Al-Dwibe, H., Elmaihub, E., Babba, H., Nattah, N., Abudher, A., 2016. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in Libya. BMC Infect. Dis. 16, 157. http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1491-5.
Gilbert, R.E., Dunn, D.T., Lightman, S., Murray, P.I., Pavesio, C.E., Gormley, P.D., Masters, J., Parker, S.P., Stanford, M.R., 1999. Incidence of symptomatic *toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. Epidemiol. Infect. 123, 283–289. http://dx.doi.org/10.1017/S0950268899002800.
Haddadzadeh, H.R., Khazraiinia, P., Aslani, M., Rezaeian, M., Jamshidi, S., Taheri, M., Bahonar, a., 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in stray and household cats in Tehran. Vet. Parasitol. 138, 211–216. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.010.
Hammond-Aryee, K., Student, M., Mmed, E., 2014. Toxoplasma gondii seroprevalence studies on humans and animals in Africa. South African Fam. Pract. 119, 119–124. http://dx.doi.org/10.1080/20786204.2014.10855349.
Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García-Pérez, A.L., 2001. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet. Parasitol. 102, 17–27. http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00526-X.
Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33, 159–174.
Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P., 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 11423–11428. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0601438103.
Lindström, I., Sundar, N., Lindh, J., Kironde, F., Kabasa, J.D., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P., Smith, J.E., 2008. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. Parasitology 135, 39–45. http://dx.doi.org/10.1017/S0031182007003654.
Lunde, M., Jacobs, L., 1983. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 69, 806–808.
Meerburg, B.G., De Craeye, S., Dierick, K., Kijlstra, A., 2012. Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. Vet. Parasitol. 184, 317–320. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.001.
Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Banuls, A.-L., Durand, P., Salle, B., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., 2010. Additional haplogroups of Toxoplasma gondii out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. PLoS Negl. Trop. Dis. 4. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000876.
Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M., de Thoisy, B., Bonnabau, H., Collinet, F., Boukhari, R., Blanchet, D., Simon, S., Carme, B., Dardé, M., 2011. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. Infect. Genet. Evol. 11, 1378–1387.
Messerer, L., Bouzbid, S., Gourbdji, E., Mansouri, R., Bachi, F., 2014. Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes dans la wilaya d'Annaba, Algérie. Rev. Epidemiol. Sante Publique 62, 160–165. http://dx.doi.org/10.1016/j.respe.2013.11.072.
Miro, G., Montoya, A., Jiménez, S., Frisuelos, C., Mateo, M., Fuentes, I., 2004. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. Vet. Parasitol. 126, 249–255. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.015.
Pena, H.F.J., Soares, R.M., Amaku, M., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2006. Toxoplasma gondii infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res. Vet. Sci. 81, 58–67. http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.09.007.
Pfefferkorn, E., Pfefferkorn, L., Colby, E., 1977. Development of gametes and oocysts in cats fed cysts derived from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 63, 158–159.
Prestrud, K.W., Dubey, J.P., Asbakk, K., Fuglei, E., Su, C., 2008. First isolate of *Toxoplasma gondii* from arctic fox (Vulpes lagopus) from Svalbard. Vet. Parasitol. 151, 110–114. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.011.
Rifaat, M.A., Salem, S.A., Khalil, H.M., Khaled, M.L.M., Sadek, M.S.M., Azab, M.E., 1975. Toxoplasmosis serological surveys among the inhabitants of some Governorates of Egypt. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 69, 118–120.
Ronday, M.J., Stilma, J.S., Barbe, R.F., McElroy, W.J., Luyendijk, L., Kolk, a H., Bakker, M., Kijlstra, a, Rothova, a, 1996. Aetiology of uveitis in Sierra Leone, west africa. Br. J. Ophthalmol. 80, 956–961. http://dx.doi.org/10.1136/bjo.80.11.956.
SU, C., Evans, D., Cole, R., Kissinger, J., Ajioka, J., Sibley, L., 2003. Recent expansion of Toxoplasma through enhanced oral transmission. Science 299 (80), 414–416.
Salant, H., Spira, D.T., 2004. A cross-sectional survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Jerusalem cats. Vet. Parasitol. 124, 167–177. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.011.
Salant, H., Weingram, T., Spira, D.T., Eizenberg, T., 2009. An outbreak of Toxoplasmosis amongst squirrel monkeys in an Israeli monkey colony. Vet. Parasitol. 159, 24–29. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.011.
Sibley, L.D., Boothroyd, C.J., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature 359, 82–85.
Spada, E., Proverbio, D., della Pepa, A., Perego, R., Baggiani, L., DeGiorgi, G.B., Domenichini, G., Ferro, E., Cremonesi, F., 2012. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and Toxoplasma gondii in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data. J. Feline Med. Surg. 14, 369–377. http://dx.doi.org/10.1177/1098612x12437352.
Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 5844–5849. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203190109.
Tenter, a M., Heckeroth, a R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30, 1217–1258. http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7.
Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bénet, J.J., Ellis, P., Moutou, F., Louzä, a., 1996. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Médecine Mal. Infect. 26, 686. http://dx.doi.org/10.1016/S0399-077X(96)80098-9.
Velmurugan, G.V., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. Vet. Parasitol. 155, 314–318. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.021.
Vigne, J.-D., Guilaine, J., Debue, K., Haye, L., Gérard, P., 2004. Early taming of the cat in Cyprus. Science 304 (80), 259.
Weiss, L.M., Kim, K., 2014. Toxoplasma Gondii, the Model Apicomplexan- Perspectives and Methods, second edi ed. .
Yai, L.E.O., Soares, R.M., Freire, R.L., Richtzenhain, L.J., 2003. Evaluation of experimental Toxoplasma gondii (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction Avaliação da infecção experimental por Toxoplasma gondii (Nicolle e Manceuax, 1909) em suínos pelas provas. Brazilian J. Vet. 227–234.