

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP



ECOLE DOCTORALE SANTE, ENVIRONNEMENT et VIE

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Annee2013

n°53

« **Identification des souches de *Toxoplasma gondii* isolées à Dakar et étude de l'efficacité de la Spiramycine dans le traitement de la toxoplasmose** »

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur en Génétique des populations

(DIPLOME D'ETAT)

Présenté et soutenu

Par

Amadou NDIAYE

Né le 26/11/1973 à Dakar

Membres du Jury

Président : Pr BHEN SIKINA TOGUEBAYE

Rapporteur : Pr NGOR FAYE

Rapporteur : Pr DAOUDA NDIAYE

Examineur : Pr JEAN LOUIS NDIAYE

Examineur : Pr YEMOU DIENG

FST/UCAD

FST /UCAD

FMPOS/UCAD

FMPOS/UCAD

FMPOS/UCAD

Directeur de thèse: **Pr PAPE MBACKE SEMBENE**

FST/UCAD

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements,

A mes parents NGATY KEBE et ASSANE NDIAYE : Que le TOUT PUISSANT vous accueille dans son paradis, ce travail est le vôtre, merci pour votre amour, pour l'ensemble des valeurs que vous m'avez inculqué et pour la vie que vous m'avez donné, tout le mérite vous revient.

A mon marabout Serigne TACKO MBACKE ibn Serigne FALLOU MBACKE ibn Serigne Cheikh Ahmadou BAMBBA : merci pour votre soutien, ce travail est le vôtre.

A toute ma famille : Adama, Maria, Fatou Kiné, Abdou Backir, Fatou, Adèle, Aissatou et Penda qui m'a toujours soutenu et aidé à traverser toutes les épreuves de la vie. Ce travail est le vôtre, encore merci de la confiance et de l'amour fraternel et chaleureux que vous portez et surtout Adama, l'ainé et la voie à suivre.

A toute la famille de Mandiaye DIARRA NDIAYE surtout Fatou Kiné SOW et Awa Cheikh NDIAYE

A mon maître et chef de service : le Professeur Niama DIOP SALL : qui, malgré ses multiples occupations professionnelles, n'a ménagé aucun effort à me soutenir, à m'adopter et me conseiller. Veuillez trouver en ce travail, cher maître, l'expression de ma profonde gratitude.

A mes épouses : Maimouna SOW et ADJA MARIANE DIOP : qui, malgré mes multiples occupations professionnelles, m'ont toujours soutenu et équilibré. Le mérite de ce travail vous revient.

A mes enfants : Lamine, Papa Samane, Adama, Mountagua, Serigne Mouhamadou Fadel Mbacké, et Aboubacry et Ngaty Kébé : trouvez en ce travail une voie à suivre et essayez toujours d'arriver plus loin et plus haut. Ce travail est le vôtre.

A mes beaux - parents : OUALIMATA FALL-MOUSSA SOW et ADJA FATOU GNING-Feu TAHIROU DIOP : merci d'avoir confiance en moi, ce travail est le vôtre.

Aux épouses de mes frères et époux de mes sœurs : Mame Penda Gueye, Bineta MBAYE, El Hadji Thierno Beye, Matar NDIONE, Mouhamed BA : merci pour tout, ce travail est le vôtre.

Aux enfants de mes frères et sœurs et à leurs époux et épouses : Mame Abdou Aziz SY NDIAYE, Amadou NDIAYE, Mariama NDIAYE, Ouleye, Djaraf, Adama, Assane NDIAYE et Rokhaya Kanté entre autres : ce travail est le vôtre.

A ma belle-famille : SOW : Lamine, Seynabou, Soda, Ahmet, Habib, Pape Moussa, Aba ; **DIOP** : Fatou, Mamie, Yama, Baye, Mouhamed, Lamine : merci pour votre fraternité et votre solidarité, ce travail est le vôtre.

A mes collègues : Dr Insa DIAW FALL, Dr OUMY PAYE et Dr Vahi ASSI: merci pour tout votre soutien et votre aide, ce travail est le vôtre.

Au professeur Pape Malick SEMBENE : merci d'avoir cru en moi et de m'avoir motivé et encouragé, merci pour tout votre soutien ; votre humilité et votre modestie sont des valeurs sûrs dont j'essayerai de m'en approprier ; ce travail est le vôtre.

A mes amis : Dr OUMAR SAMBA, Maimouna DIOP, Mouhamed DIOP, Omar SALL, Abou ATHIE, Ndeye Michelle COURA SOW, Arona DIOP, PAPA AYA MBAYE, Lamine NGOM : merci pour tout votre soutien et votre aide, ce travail est le vôtre.

A tout le personnel du laboratoire : Mame Dior FAYE, Biram MBAYE, Marième LY, Penda NDIAYE, Aby NDIAYE, Bigué MBAYE, Madeleine NDIAYE, Madjiguène NDOYE, Ndické SARR, Souleymane SY, Thierno SY, Ibrahima SOW, AWA DIEYE, Aicha FAYE, Souleymane Coulibaly, Ramatoulaye Diallo, Marie Thomasia SARR, Adama SECK, Saye DIOP, Agathe SAGNA : merci pour votre soutien, ce travail est le vôtre.

DEDICACES

Je dédie ce travail à

Mes parents : NGATY KEBE et ASSANE

Mon grand frère Monsieur ADAMA NDIAYE

Mon guide Serigne Mouhamad Fadal Mbacké

Ma maman adoptive NDEYE MAREME NDIAYE

Mon marabout Serigne El Hadji TACKO MBACKE

Mr Khalifa Ababacar SALL, maire de la Ville de Dakar

Mr MOUSSA SY, ami et maire des Parcelles Assainies

Docteur MALICK DIOP, Directeur ASSEPEX et Maire de Point E

Mr. ABDOULAYE DIOUF SARR, Directeur du COUD de DAKAR

Docteur YOUSSEPH NDIAYE, Directeur de l'hôpital Abass NDAO

Mr. El hadji Babacar Mbaye Nguirane Mbengue, grand Djaraf de Yoff

Pr Niama Diop SALL, chef du service des laboratoires de l'hôpital Abass NDAO

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre maître, juge et président de jury, Monsieur Bhen Sikina TOGUEBAYE
Professeur à la faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD :

C'est un grand honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury pour la soutenance de cette thèse et de juger ce travail. Un livre entier ne suffirait pas à vous caractériser. Nul ne peut parler de recherche scientifique sans citer votre nom, vous nous avez inspiré à bien des égards.

Votre passion pour le travail et votre esprit scientifique nous ont toujours impressionnés. Votre modestie, votre humilité et votre discrétion dans le travail sont connues et appréciées de tous. Soyez assuré de notre profonde affection.

A notre maître et juge : Mr NGOR FAYE, Professeur à la faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD :

Malgré vos multiples occupations, vous acceptez spontanément de juger ce travail en qualité de rapporteur. Nous avons hautement apprécié la clarté et la valeur de votre enseignement durant le master de biologie animale, spécialité parasitologie. Votre disponibilité constante et votre passion pour les Sciences et Techniques nous ont séduites à bien des égards. Nous vous sommes infiniment reconnaissants pour l'intérêt que vous avez manifesté pour ce travail et de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de faire partie du jury.

A notre maître et juge Mr Daouda NDIAYE, Professeur à la faculté de médecine, de pharmacie et d'Odontostomatologie : Je ne trouve pas les mots qu'il faut pour vous qualifier par crainte de les trahir. Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté spontanément de juger ce travail en qualité de rapporteur. Nous avons hautement apprécié la clarté et la valeur de votre enseignement durant le DES-BC et dans la vie professionnelle en générale. Je me suis toujours senti fier d'être le produit brut de la parasitologie de l'hôpital Aristide A Le Dantec et ce, grâce à votre travail et votre encadrement continu.

Vous avez su germer en moi l'amour de la parasitologie et vous m'avez toujours aimé en temps que frère de sang. Merci d'avoir cru en moi et de continuer à me pousser encore plus loin. Nous vous sommes infiniment reconnaissants pour l'intérêt que vous avez manifesté pour ce travail et de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de faire partie du jury.

A notre maître et juge : Mr YEMOU DIENG, Professeur à la faculté de médecine, de pharmacie et d'Odontostomatologie :

Malgré vos multiples occupations, vous acceptez spontanément de juger ce travail en qualité d'examineur. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de faire partie du jury.

Votre disponibilité, votre humilité et votre esprit scientifique vous ont valu l'admiration de tous. Vous me rendez toujours fier et honoré en vous voyant ou en assistant à un de vos enseignements. Nul ne peut ignorer vos qualités de hauts scientifiques, humbles et posés.

Vous m'avez beaucoup inspiré et j'avoue être un de vos fidèles admirateurs. Veuillez trouver ici l'expression de notre respect et de notre profonde gratitude.

A notre maître et juge : Mr JEAN LOUIS NDIAYE, Professeur à la faculté de médecine, de pharmacie et d'Odontostomatologie :

Malgré vos multiples occupations, vous acceptez spontanément de juger ce travail en qualité d'examineur. Nous avons hautement apprécié la clarté et la valeur de votre enseignement

durant le DES-BC. Votre disponibilité constante et votre passion pour la parasitologie nous ont séduites à bien des égards. Nous vous sommes infiniment reconnaissants pour l'intérêt que vous avez manifesté pour ce travail et de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de faire partie du jury ainsi que tout l'aide que vous avez consenti en vue de l'aboutissement de ce travail.

A notre maitre, juge et directeur de recherche : Monsieur PAPE MBACKE SEMBENE,
professeur à la FST

Aujourd'hui, il nous est pratiquement impossible de trouver les mots suffisants pour exprimer les sentiments que nous avons envers vous. Votre compétence, votre gentillesse, votre courtoisie, votre simplicité et votre humilité sont les compléments de vos hautes qualités d'enseignant. Nous vous exprimons toute notre fierté d'avoir travaillé à vos côtés. Encore, permettez nous de vous remercier du fond de notre cœur car sans votre confiance en nous, votre détermination et votre instinct de chercheur avéré, ce travail ne verrait point le jour. Tout l'honneur vous revient.

Soyez assuré cher Maitre de notre admiration et de notre attachement à jamais.

Sigles & acronymes

ADHS : Agglutination directe haute sensibilité

ADN : acide désoxyribonucléique

AFNOR: Agence Française de Normalisation

Al₂(SO₄)₃ : sulfate d'ammonium

anti-Mic : anticorps dirigé contre l'antigène du microneme

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate

BSA: Serum Albumine Bovine

c:conoide

°C: celcius

C+ : seuil positif

CABM : Centre d'Analyses de Biologie Médicale

CD4+ : Clusters de Différentiation de type 4

CHAN : centre hospitalier Abass NDAO

COWP : paroi de l'oocyste de *Cryptosporidium parvum*

CRB : Centre de Ressources Biologiques

CTAB : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DL : dose létale

DOPA : 3,4 dihydroxyphénylalanine

DT : Dye test

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay

EIA : méthode immunoenzymatique en phase solide

6FAM :6 carboxyfluorescéine

Fe₂(SO₄)₃ : Sulfate de fer

g:gramme

GEHV : Gelman Envirochek High Volume

GES : Gelman Envirochek Santard

GRA : granule dense

h:heure

HEX : Hexachloro-6-Carboxyfluorescéine

HI : Hôte intermédiaire

HS : Hautement Sensible (High sensibility)

H₂SO₄ : Acide sulfurique

IC : Intervalle de Confiance

IFA : immunofluorescence indirecte assay

Ig G : Immunoglobine G

IgM : Immunoglobine M.

IHA : hémagglutination indirecte assay

IM : intramusculaire

IMS. : Séparation Immunomagnétique

j:jour

KDa : kilodalton

KGy : kilograys

KI : iodure de potassium

K₂Cr₂O₇: Bichromate de potassium

L : litre

L* : inclusions lipidiques (schémas)

m:micronéme

Ma : Macrogamétocyte

Mi : Microgamétocyte

Mic : Antigène du Micronème

mg : milligramme

mg/k/j : milligramme par kilogramme de poids corporel et par jour

min : minute

mM : millimole

ml : millilitre

Mpa : méga pascal

MS : Multilocus microsatellite

N ou n: noyau

NaClO : hypochlorite de sodium

NaOH : soude

Nbre : nombre

NTU : Unité néphélométrique de la turbidité des eaux

OW : oocyste intra-luminal

pb : paire de base

PBS: phosphate buffered saline

PCR : Polymérase Chain Réaction

PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Length Polymorphism

pH : potentiel Hydrogène

per os : voie orale

POP4 : gel de polyacrylamide

p.p.i: pour préparations injectables

pv : vacuole parasitophore

q.s.p: quantité suffisante pour

r: rhoptrie

REL : Réticulum endoplasmique lisse

RT-PCR : « Reverse transcriptase-PCR »

S : schizonte

S1 : première sérologie

S2 : Deuxième sérologie

S3 : Troisième sérologie

SAG : surface antigen glycoprotein

SDS : sodium dodécyl sulfate

sp : surface protéine (déterminants glycoprotéiques)

SVFI : sérum de veau fœtal inactivé

SW : plaques sporocystiques enroulées

T : titre

T. gondii : Toxoplasma gondii

TgOWP : protéine putative

Toxo: Toxoplasmose

Tween 80 : polyoxyéthylènesorbitan monoléate

UI: Unités Internationales

UV : Ultra Violet

v: voile lâche

VFB : veil-forming bodies

W ou WFB: Wall forming bodies

μl : microlitre

μm : micromètre

μM : micromole

% : pour cent

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Les différents stades évolutifs de <i>Toxoplasma gondii</i> (Dubey, Lindsay, et al., 1998).....	3
<u>Figure 2</u> : Cycle évolutif de <i>Toxoplasma gondii</i> (Ferguson, 2002).....	4
<u>Figure 3</u> : Formation de la paroi de l’oocyste non sporulé de toxoplasme observée en microscopie électronique (Ferguson et al., 2000).....	7
<u>Figure 4</u> : Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique (Dubey, Lindsay et al., 1998 ; Speer et al., 1998).....	9
<u>Figure 5</u> : Autofluorescence des oocystes non sporulés et sporulés de toxoplasme(Lerher et Fasman, 1967 ; Belli et al., 2003).....	11
<u>Figure 6</u> : Méthodes de détection des oocystes de toxoplasme dans les matrices environnementales (Dumetre Aurélien, 2005).....	31
<u>Figure 7</u> : Objectifs de l’étude et méthodologie appliquée.....	33
<u>Figure 8</u> : Exemple d’électrophorèse sur gel d’agarose après amplification de cinq marqueurs microsatellites par PCR multiplexe (Ajzenberg et al., 2005).....	49
<u>Figure 9</u> : Exemple d’électrophorèse des produits de PCR multiplexe d’un génotype II (Me49) sur séquenceur automatique (Ajzenberg et al., 2005).....	50
<u>Figure 10</u> : Principe de la réaction IgG.....	80
<u>Figure 11</u> : Principe de la réaction IgM.....	80
<u>Figure 12</u> : Illustration du mode opératoire.....	81
<u>Figure 13</u> : Matérialisation des spots sur les dents des peignes.....	82
<u>Figure 14</u> : Calibration de la règle sur le CombScals en vu de la quantification.....	82

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Survie des oocystes sporulés de toxoplasme dans l'eau et les matrices solides.....	12.13
<u>Tableau 2</u> : Séroprévalence de la toxoplasmose chez le mouton en France.....	18
<u>Tableau 3</u> : Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes.....	21.22
<u>Tableau 4</u> : Principales caractéristiques biologiques et épidémiologiques des génotypes de <i>T. gondii</i> (d'après Dardé, 2004).....	23
<u>Tableau 5</u> : Variation mensuelle de la toxoplasmose au CHAN du 01 janvier au 30 Novembre 2012.....	35
<u>Tableau 6</u> : Prévalences moyenne et globale chez le chat et le chien.....	36
<u>Tableau 7</u> : Résultats positifs de la première sérologie en fonction du type d'anticorps.....	41
<u>Tableau 8</u> : répartition des examens sérologiques en fonction des motifs de consultation et des anticorps de type IgM.....	42
<u>Tableau 9</u> : répartition des examens sérologiques en fonction des motifs de consultation et des anticorps de type IgG.....	43
<u>Tableau 10</u> : Résultats positifs de la deuxième sérologie en fonction du type d'anticorps.....	43
<u>Tableau 11</u> : Répartition des sérologies positives en fonction du titre d'IgG au premier control.....	44
<u>Tableau 12</u> : Répartition des sérologies positives en fonction du titre d'IgG au second control.....	44
<u>Tableau 13</u> : Répartition des sérologies positives en fonction du titre d'IgG au second control.....	45
<u>Tableau 14</u> : Résultat selon le génotype trouvé.....	50
<u>Tableau 15</u> : Multilocus microsatellite (MS) Génotypage issus de 51 isolats de <i>Toxoplasma gondii</i> issus de milieux anthropisés et sauvages en Guyane français (Ajzenberg et al. 2010).....	51
<u>Tableau 16</u> : Résumé du mode opératoire.....	81

Liste des annexes

<u>Annexe 1</u> : Méthode de dosage (chez la femme) : Immunocombs.....	80-83
<u>Annexe2</u> : Données du CRB sur la toxoplasmose congénitale et Technique multiplex.....	84-88
<u>Annexe 3</u> : Recherche des kystes tissulaires de toxoplasme par digestion pepsique selon Dubey (1998c).....	89
<u>Annexe 4</u> : Tampons pour l'extraction de l'ADN des sporocystes de toxoplasme.....	90
<u>Annexe 5</u> : Séquence du gène AF146527 (Homan et al., 2000), amorces et sondes utilisées.....	91
<u>Annexe 6</u> : Marqueurs génétiques utilisés pour le typage des isolats de toxoplasme (selon Ajzenberg et al., 2004).	92
<u>Annexe 7</u> : Polymorphisme de longueur allélique pour cinq microsatellites considérés.....	93
<u>Annexe 8</u> : Méthodes d'analyses statistiques des résultats.....	94

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Objectif général de l'étude	2
<u>PARTIE 1</u> : Généralités sur la Toxoplasmose	
1. Cycle évolutif du toxoplasme.....	3.4
2 .Oocystogenèse.....	4
2.1. Stades entéroépithéliaux.....	4.5
2.1.1. Mérozoïtes.....	5
2.1.2. Microgamétocyte et microgamètes mâles.....	5
2.1.3. Macrogamétocyte et macrogamète femelle.....	5
2.1.4. Fécondation.....	6
2.1.5. Formation de la paroi de l'oocyste.....	6.7
2.1.6. Émission des oocystes.....	7
2.2. Sporulation.....	8
2.2.1. Paramètres physico-chimiques.....	8
2.2.2. Ultrastructure.....	8.9
2.2.3. Antigènes.....	10
2.2.4. Autofluorescence.....	10.11
3. Résistance aux conditions environnementales et aux procédés d'inactivation.....	11
3.1. Facteurs physiques.....	12
3.1.1. Température.....	12.13
3.1.2. Dessiccation.....	13
3.1.3. Rayonnements.....	13
3.1.4. Hautes pressions.....	14
3.2. Facteurs chimiques.....	14
3.2.1. Acides et bases.....	14
3.2.2. Désinfectants et détergents.....	14
3.2.3. Enzymes.....	15
4. Importance des oocystes dans la transmission de la toxoplasmose.....	15
4.1. Réservoir d'émission.....	15
4.1.1. Chat domestique (Felis catus).....	15.16
4.1.2. Félins sauvages.....	16
4.2. Dissémination et prévalence dans les matrices environnementale.....	16
4.2.1. Sol.....	16
4.2.2. Eau.....	16.17
4.2.3. Végétaux.....	17
4.3. Exemples d'espèces animales soumises à l'infection par les oocystes.....	17
4.3.1. Rongeurs.....	17
4.3.2. Oiseaux.....	17.18
4.3.3. Ovins.....	18.19
4.3.4. Mammifères marins.....	19.20
4.4. Le rôle des oocystes dans l'infection humaine.....	20
4.4.1. Facteurs de risque associés aux oocystes.....	20
4.4.2. Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes.....	20.22
4.5. Association avec des génotypes particuliers.....	22
4.5.1. Diversité génétique du toxoplasme : outils d'analyse et biais de sélection.....	22
4.5.2. Structure génétique de T. gondii.....	23

4.5.3. Quels génotypes circulent dans l'environnement ?	23.24
5. Méthodes de détection des oocystes	24
5.1. Stratégies d'échantillonnage	24.25
5.2. Détection dans l'eau	25
5.2.1. Concentration	25
5.2.1.1. Filtration	25.26
5.2.1.2. Flocculation	26.27
5.2.1.3. Centrifugation	27
5.2.2. Purification	27
5.2.2.1. Flottation	27
5.2.2.2. Séparation par immunomagnétique (IMS)	27.28
5.2.2.3. Cytométrie en flux	28
5.2.3. Détection	28
5.2.3.1. Microscopie	28
5.2.3.2. Analyse moléculaire	28.29
5.2.3.3. Vitalité et virulence	29
5.3. Détection dans les matrices solides	30
5.4. Synthèse des méthodes proposées	30.31
6. Conclusion – Objectifs	32.33

PARTIE 2: TRAVAIL PERSONNEL

I-Etude épidémiologique	34
A-Détermination de la séroprévalence chez la femme et chez les animaux (chien et chat)	34
Objectif du travail	34
I-1-Population d'étude	34
I- 2-Matériel et méthode de dosage	34
I-2-1-Matériel	34
a)Matériel technique	34
b)Matériel biologique	34
I-2-2-Méthode de dosage	34
I-2.2.1 : Chez la femme	34.35
I-2.2.2 : Chez les animaux (Chien et chat)	35
I-3-Résultats et Discussion	35
I-3-1-Résultats	35
a)Chez la Femme	35
b)Chez le chien et le chat	35.36
I-3-2-Discussion	37.39
Conclusion pour cette partie	40
B -Evaluation de l'efficacité ou non du traitement de la toxoplasmose par la Spiramycine	41
Objectif du travail	41
I-1-Population d'étude	41
I- 2-Matériel et méthode de dosage : Identique au (A)	41
I-3-Résultats et Discussion	41
I-3-1-Résultats et interprétation	41
a)Données sérologiques	41
a1) A la première sérologie (S1)	41
a-1-1-Selon les anticorps de type IgM	42
a-1-2- Selon les anticorps de type IgG	42.43
a2) A la deuxième sérologie (S2) : (à un mois d'intervalle sous traitement)	43.44

a3) A la troisième sérologie (S3) : (à un mois d'intervalle sous traitement).....	44.45
I-3-2-Discussion.....	46.47
Conclusion pour cette partie.....	47
II- Identification des souches de <i>Toxoplasma gondii</i> isolées à Dakar	48
Objectif du travail.....	48
II-1-Population d'étude.....	48
II-2-Méthodologie.....	48
II-3- Typage génétique des toxoplasmes isolés.....	48.50
II-4-Résultats.....	50
II-4-1-Selon le nombre de Géotype trouvé.....	50
II-4-2-Selon la nature des Géotypes.....	50.51
II-5-Discussion.....	52.53
Conclusion pour cette partie.....	53
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	54
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES.....	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	56.79
Annexes	80.94
Résumé.....	95

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le toxoplasme (*Toxoplasma gondii*) est l'agent d'une anthroponose cosmopolite : la toxoplasmose. Ce parasite intracellulaire entretient un cycle hétéroxène facultatif entre les félins (hôtes définitifs) et les autres homéothermes (hôtes intermédiaires).

La toxoplasmose est presque toujours asymptomatique mais elle peut être sévère chez l'individu immunodéprimé ou après transmission congénitale. L'importance médicale et vétérinaire de la toxoplasmose motive depuis 50 ans de nombreuses études épidémiologiques afin d'identifier les réservoirs et les modes de transmission du parasite (Tenter et al., 2000). La consommation de viande crue ou peu cuite contenant des kystes du parasite et l'ingestion d'oocystes avec les fruits et légumes souillés par des fèces de chats sont les deux principaux modes de contamination. Plus récemment, la consommation d'eau contaminée par les oocystes a été retenue comme facteur de risque de toxoplasmose au Brésil (Bahia-Oliveira et al., 2003). Des épidémies d'origine hydrique ont été à l'origine de toxoplasmoses symptomatiques parfois mortelles au Panama (Benenson et

al., 1982), au Canada (Bowie et al., 1997) et au Brésil (Taverne, 2002). La séroprévalence de la toxoplasmose humaine varie en fonction des zones géographiques. En Europe, elle est de 30 à 50 % dans la majorité des pays du centre et de l'ouest ; elle devient inférieure à 30 % dans le nord. Des prévalences faibles sont notées en Amérique du Nord, en Asie du Sud-Est et dans quelques pays africains (Niger, Afrique du Sud) (Tenter et al., 2000). Les prévalences les plus fortes (> 60 %) s'observent principalement parmi les pays bordant le golfe de Guinée et en Amérique latine. Ces disparités sont principalement dues à la plus grande survie des oocystes sous des climats humides. Il y a peu d'infections dans les régions où les chats sont absents (Dubey, Rollor, et al., 1997). Les oocystes ont un rôle central dans la transmission du parasite car ils contaminent l'homme directement, ou indirectement via les animaux de boucherie. Dans la perspective d'évaluer le risque de toxoplasmose liée aux oocystes, il est nécessaire de préciser la prévalence des oocystes dans l'environnement. Cela n'est possible qu'en disposant de méthodes de détection spécifiques et sensibles car la probabilité d'isoler des oocystes dans un échantillon naturellement contaminé pris au hasard est très faible. Étudier la séroprévalence de la toxoplasmose chez les animaux herbivores est également une méthode intéressante pour évaluer indirectement la prévalence des oocystes dans l'environnement.

Le travail que nous présentons ici s'inscrit dans la préoccupation tout à fait récente d'identifier les souches du parasite *Toxoplasma gondii* qui circule à Dakar au Sénégal et d'étudier l'efficacité de la Spiramycine sur le traitement de la toxoplasmose.

La première partie de ce travail est une étude bibliographique de la biologie des oocystes, de leur rôle épidémiologique et des méthodes actuelles pour les détecter.

La seconde partie correspond à notre étude expérimentale. Celle-ci décrit la nature des souches de toxoplasme isolées à Dakar comparé à celle des souches de référence mais aussi l'étude de l'efficacité de la Spiramycine sur le traitement de la toxoplasmose tout en présentant également les résultats de la prévalence du parasite chez le chat et le chien (animaux domestiques compagnons de l'homme) susceptibles d'infecter l'homme à partir des oocystes.

1 ère partie

PARTIE 1: Généralités sur la Toxoplasmose

1. Cycle évolutif du toxoplasme

Toxoplasma gondii est une coccidie intestinale du chat. Elle est la seule espèce du genre *Toxoplasma* (annexe 1). Le toxoplasme est capable d'infecter tous les organismes homéothermes par l'un des trois stades évolutifs suivants : tachyzoïte, bradyzoïte ou sporozoïte (figure 1). Les tachyzoïtes augmentent la densité parasitaire chez l'hôte ; bradyzoïtes et sporozoïtes sont protégés dans des structures kystiques et permettent la transmission entre hôtes. Le cycle parasitaire peut s'effectuer entre hôte définitif et hôtes intermédiaires (cycle sexué) ou entre hôtes intermédiaires (cycle asexué) (figure 2).

Le cycle sexué débute dans l'épithélium intestinal des félins. Une schizogonie puis une gamétogonie aboutissent à la formation d'oocystes immatures qui sont émis en grande quantité avec les fèces. Après sporulation, les oocystes sont rapidement disséminés et conservent leur pouvoir infectant dans le sol et l'eau pendant plusieurs mois. Leur ingestion par les hôtes intermédiaires entraîne le dékystement des sporozoïtes et leur conversion en tachyzoïte (phase aiguë). Une phase chronique s'établit après différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes. Ces derniers se regroupent pour former des kystes qui semblent perdurer toute la vie de l'hôte, plus particulièrement dans les tissus nerveux et musculaires. Le cycle est complet quand l'hôte définitif s'infecte en ingérant une proie contenant des kystes.

Le cycle asexué a lieu entre hôtes intermédiaires. L'ingestion de kystes tissulaires est à l'origine d'une série de différenciations bradyzoïte → tachyzoïte → bradyzoïte, qui aboutit à la formation et à la persistance de kystes tissulaires.

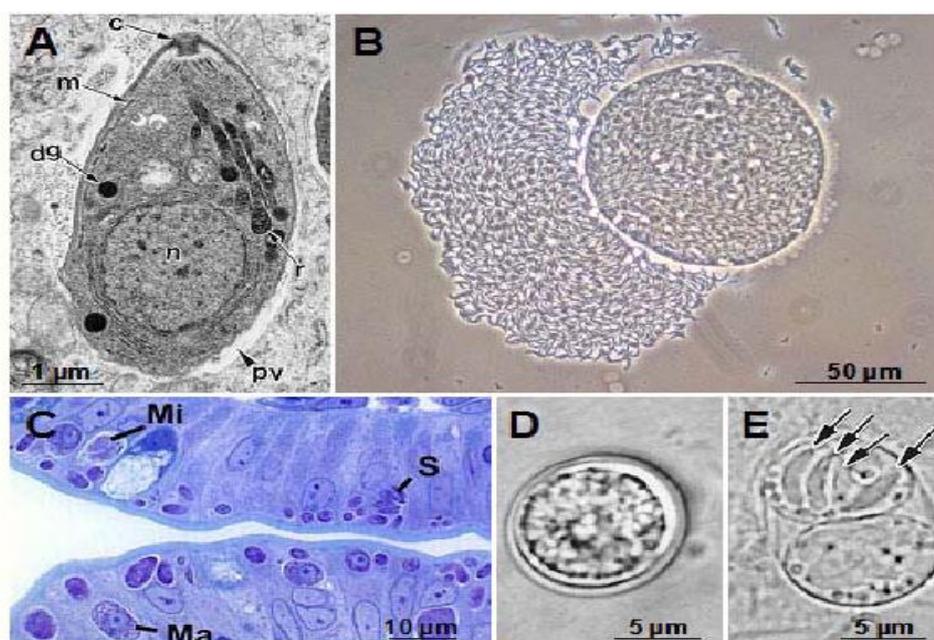


Figure 1: Les différents stades évolutifs de *Toxoplasma gondii*.(A) Ultrastructure d'un

tachyzoïte en microscopie électronique : c, conoïde ; dg, granule dense ; m, micronème ; n, noyau ; pv, vacuole parasitophore ; r, rhoptrie. (B) Un kyste libérant ses bradyzoïtes après digestion trypsique de la paroi kystique (photo M.L. Dardé). (C) Stades entéroépithéliaux : Ma, macrogamétoocyte ; Mi, microgamétoocyte ; S, schizonte (Ferguson, 2004). (D) Oocyste non sporulé. (E) Oocyste sporulé contenant deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes (flèches) (Dubey, Lindsay, et al., 1998).

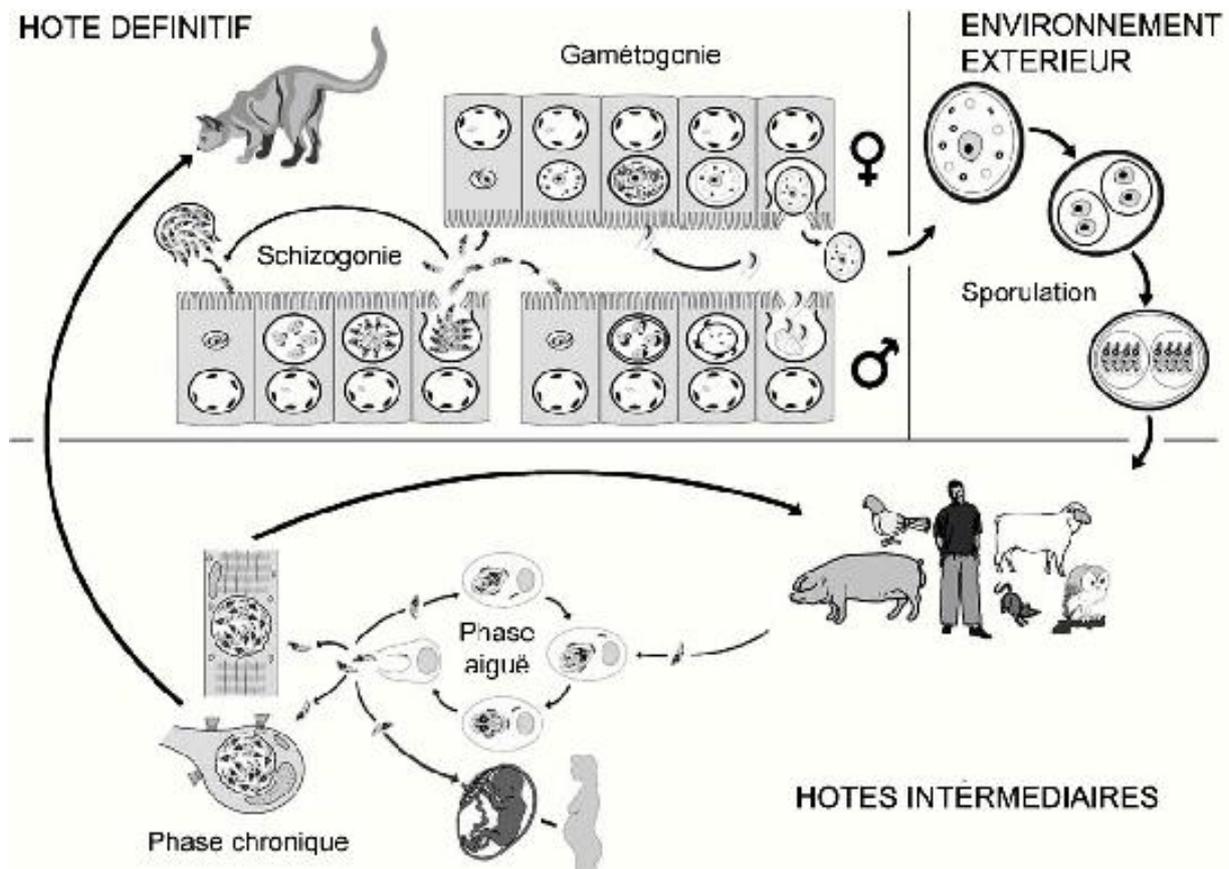


Figure 2 : Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* (Ferguson, 2002).

2. Oocystogenèse

2.1. Stades entéroépithéliaux

Les stades entéroépithéliaux (mérozoïtes, stades sexués et oocyste) ont été décrits chez le chat domestique (*Felis catus*) après infection expérimentale par des kystes. Ce mode de contamination semble naturellement prépondérant chez les félins. Après ingestion, la paroi kystique est détruite par les enzymes gastriques et les bradyzoïtes sont libérés dans l'estomac. La résistance relative des bradyzoïtes à la pepsine (3 heures (h) en conditions expérimentales ; Dubey, 1998a) leur permet de coloniser l'épithélium jéjunal 2 h après infection (Dubey et Frenkel, 1972). La colonisation d'un entérocyte entraîne la formation d'une vacuole parasitophore à paroi épaisse (Hutchison et al., 1971, Ferguson et al., 1974), un déplacement et une hypertrophie nucléaire (Dubey et Frenkel, 1972), et une réduction de la taille des microvillosités qui perdure jusqu'à la fin de l'émission des oocystes

(Ferguson et al., 1976). Une même cellule peut héberger plusieurs stades de développement (Hutchison et al., 1971). L'infection provoque des modifications structurales des entérocytes même s'ils n'hébergent pas de parasite (Ferguson et al., 1976). Tous les stades intestinaux du parasite contiennent des granules d'amylopectine (Dubey et Frenkel, 1972).

2.1.1. Mérozoïtes

Les mérozoïtes se développent au sein de schizontes de types A à E. Leur morphologie a été décrite par Dubey et Frenkel (1972) et Speer et Dubey (2005). Ferguson et al. (1974) ont décrit en microscopie électronique, un type unique, 7 jours après infection, ce qui correspond chronologiquement à un type D ou E (Dubey et Frenkel, 1972). Cette description est retenue ci-dessous. Le jeune schizonte possède une chromatine distribuée en petites mottes (critère de différenciation avec le jeune microgamétocyte). Deux membranes en forme de dômes apparaissent près de chaque noyau et deviennent la membrane interne des futurs mérozoïtes. Les mérozoïtes se développent jusqu'à l'assimilation complète du cytoplasme du schizonte. La membrane externe du schizonte devient au fur et à mesure du développement des mérozoïtes leur membrane externe par invagination et fusion. Les mérozoïtes formés se séparent, se retrouvent libres dans la vacuole parasitophore et quittent la cellule hôte pour infecter de nouvelles cellules.

2.1.2. Microgamétocyte et microgamètes mâles

Les microgamétocytes immatures ressemblent aux types D et E mais leurs noyaux sont plus petits et entourés d'un halo clair (Dubey et Frenkel, 1972). Le noyau du jeune microgamétocyte se divise pour former jusqu'à 32 noyaux qui se concentrent à sa périphérie. A partir de chaque noyau, une extrusion apparaît en dehors du microgamétocyte ; elle contient un microgamète en développement (Ferguson et al., 1974). A maturité, le microgamète est biflagellé et possède un noyau dense et allongé et une mitochondrie unique. Les microgamètes s'échappent du microgamétocyte et se trouvent libre dans la vacuole parasitophore. Chaque microgamétocyte (7-10 x 5-8 μm) donne naissance à 6 à 32 microgamètes, en moyenne 12 (4-5 μm , flagelle 6-10 μm). Les microgamétocytes représentent 2 à 4% du total des gamétocytes matures (Hutchison et al. 1971 ; Dubey et Frenkel, 1972).

2.1.3. Macrogamétocyte et macrogamète femelle

Les macrogamétocytes immatures ont un grand noyau et ressemblent aux types D et E (Dubey et Frenkel, 1972). La phase de différenciation en macrogamète est marquée par l'accumulation de matériel nourricier sous forme de granules lipidiques et polysaccharidiques, et par l'apparition d'organites spécialisés dans la formation de la paroi de l'oocyste appelés « wall forming bodies » (WFB) (Ferguson et al., 1975). A maturité, le macrogamète mesure 7-8 x 4-7 μm et est entouré d'une pellicule percée de nombreux micropores (Dubey et Frenkel, 1972).

2.1.4. Fécondation

La fécondation du macrogamète par un microgamète n'a jamais été observée. Compte tenu du sex - ratio très favorable aux macrogamètes, la fécondation ne serait pas le seul processus intervenant dans la production de plusieurs dizaines de millions d'oocystes. Ainsi, les macrogamètes non fécondés pourraient subir une parthénogenèse pour former des oocystes capables de sporuler (Ferguson, 2002).

2.1.5. Formation de la paroi de l'oocyste

Le stimulus déclenchant la formation de la paroi de l'oocyste pourrait être la fécondation du macrogamète. La paroi de l'oocyste est composée de plusieurs couches qui apparaissent au cours du développement du jeune oocyste. L'apparition d'une couche est liée à la disparition concomitante d'un type de WFB (ou W dans les figures 3A, 3B et 3D). Les WFB1 mesurent 0,35 µm de diamètre et sont protégés par une membrane unique. Ils se développent par bourgeonnement à partir du réticulum endoplasmique lisse (REL). Deux populations de WFB1 coexistent dans le macrogamète mature. Les WFB1a sont périphériques, ont un contenu homogène dense aux électrons et réagissent avec un sérum polyclonal anti-MIC4 (antigène de micronème) (Ferguson et al., 2000 ; Brecht et al., 2001). Les WFB1b occupent une position plus centrale, ont un contenu hétérogène et sont MIC4 négatifs. Les WFB2 se forment dans les lacunes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). A maturité, ils mesurent 1,2 µm, sont moins denses aux électrons et moins nombreux que les WFB1. Ils sont limités par une double membrane dont la plus externe provient du RER. Les WFB2 sont MIC4 négatifs (Ferguson et al., 2000). La formation de la paroi de l'oocyste non sporulé débute par l'agrégation de matériel de nature inconnue à l'extérieur de la pellicule du macrogamète (couche 1). Une deuxième puis une troisième couche (parfois confondues) apparaissent sous la couche 1. Les couches 1, 2 et 3 forment un voile lâche MIC4 positif entourant l'oocyste (Ferguson et al., 2000) (figures 3B, 3C et 3E). Sa formation est associée à la disparition des WFB1a, auxquels le nom de VFB (pour veil-forming bodies) a été donné récemment (Ferguson et al, 2000). La fonction de ce voile n'est pas connue. Il peut être observé après émission et sporulation (Speer et al, 1998). La formation de la couche 4 est associée à la disparition des WFB1b (figure 3B). La couche 4 se forme entre le voile et la pellicule (figure 3C). La couche 4 est électron-dense (figure 3E). La couche 5, plus épaisse, se forme entre la couche 4 et la pellicule. Elle apparaît moins dense aux électrons. La formation de cette couche est associée à la disparition des WFB2 (figures 3D et 3E).

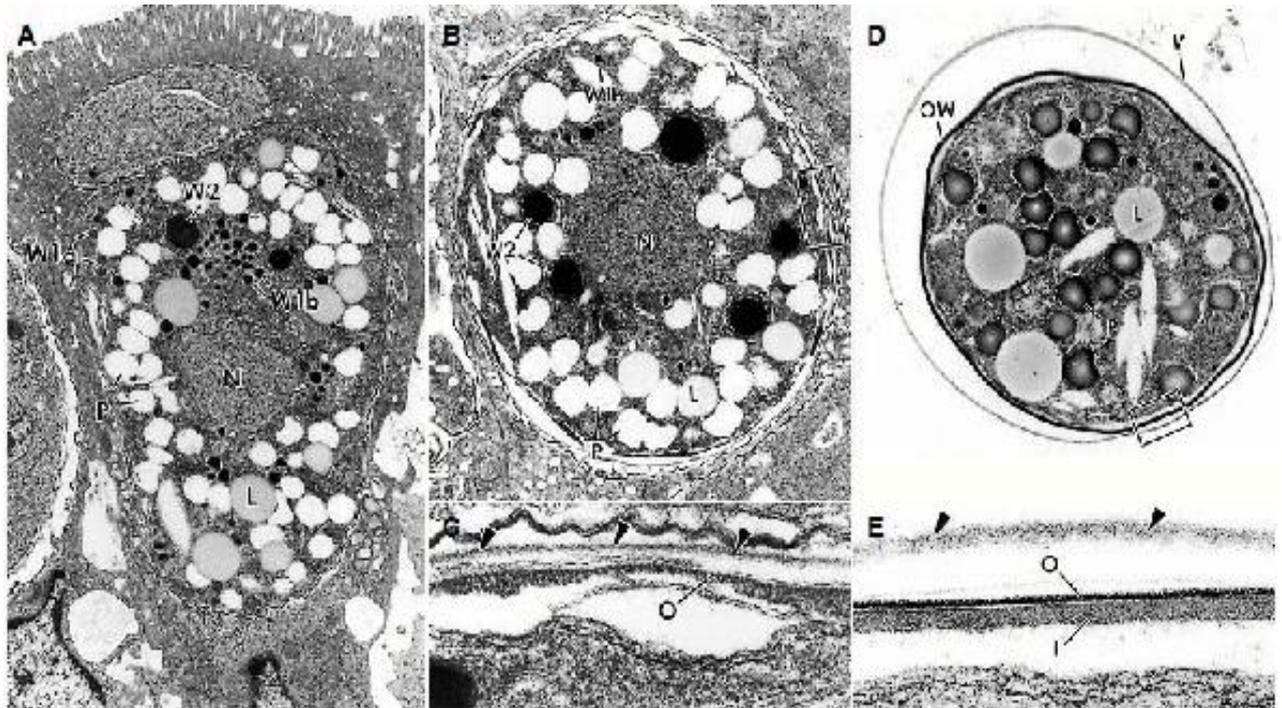


Figure 3 : Formation de la paroi de l’oocyste non sporulé de toxoplasme observée en microscopie électronique (Ferguson et al., 2000). (A) Macrogamète mature contenant autour de son noyau (N) des inclusions lipidiques (L) et polysaccharidiques (P) et trois sous-populations de wall-forming bodies (W1a, W1b et W2). (B) Jeune oocyste dont la paroi est partiellement formée : les W1a ont disparu et le nombre de W1b a nettement diminué. (C) Détail de la paroi du jeune oocyste montrant le voile formé (flèches) et la couche 4 externe en développement (O). (D) Oocyste intra-luminal dont la paroi (OW) est entourée d’un voile lâche (V). (E) Détail de la paroi de (D) montrant le voile lâche (flèches), la couche 4 externe (O) et la couche 5 interne (I).

2.1.6. Émission des oocystes

Les oocystes non sporulés sont libérés dans la lumière intestinale et sont émis quotidiennement avec les fèces pendant quelques jours. Ils ont une structure identique à celle des oocystes présents dans les entérocytes, notamment un cytoplasme contenant un nucléoplasme amorphe et un nucléole distinct (Ferguson et al., 1975 ; Ferguson et al., 1979a). L’ultrastructure de la paroi de l’oocyste fraîchement émis est inconnue mais pourrait ressembler à la description précédente. L’infection par des bradyzoïtes aboutit presque toujours à l’émission d’oocystes en grande quantité (entre 10^7 et 10^8 au total) avec une période pré-patente de 3 à 10 jours (j) et une période patente de 15 à 21 j. Un pic quantitatif est souvent constaté entre les 2^{ème} et 4^{ème} j d’émission. La quantité émise est indépendante de la taille de l’inoculum puisqu’un seul bradyzoïte ingéré engendre plusieurs dizaines de millions d’oocystes (Dubey, 2001). Au contraire, une contamination par des tachyzoïtes ou des oocystes n’entraîne que dans 10 à 30% des cas une émission d’oocystes, généralement moins profuse et moins longue, et après une période pré-patente supérieure à 19 j (Dubey, 1996b ; 2002a).

2.2. Sporulation

La sporulation est un processus asynchrone. Dans une suspension, environ 20% d'oocystes semblent incapables de sporuler (données expérimentales de Dumetre Aurélien). Elle débute 6 h après l'émission (Ferguson et al., 1979a). Le noyau de l'oocyste non sporulé subit une méiose réductionnelle suivie d'une mitose des deux noyaux précédemment formés. Les quatre noyaux haploïdes se trouvent contenus dans deux sporoblastes sphériques issus d'une division cytoplasmique (Ferguson et al., 1979a). Puis les sporoblastes s'allongent pour former les sporocystes (Ferguson et al., 1979b). Les deux membranes externes des sporoblastes deviennent la membrane externe du sporocyste et le plasmalemme du cytoplasme devient la membrane interne. Dans chaque sporocyste, deux sporozoïtes se développent à partir de plaques denses situées près de chaque noyau. Puis après une division nucléaire, quatre sporozoïtes sont complètement formés, laissant un corps résiduel entouré d'une membrane unique (Ferguson et al., 1979c).

2.2.1. Paramètres physico-chimiques

Le succès de la sporulation dépend de la température, des conditions d'aérobiose et d'hygrométrie. Expérimentalement, la sporulation est d'autant plus longue que la température est faible : 21 j à 11°C contre 48 h à 25°C (Dubey, Miller et al., 1970b). D'une façon générale, les oocystes perdent leur capacité à sporuler après congélation 1 j à -21°C ou 7 j à -6°C (Frenkel et Dubey, 1973) ou après exposition à la chaleur 24 h à 37°C ou 10 minutes (min) à 50°C (Dubey, Miller et al., 1970b). La sporulation est encore possible après conservation des oocystes non sporulés à 4°C pendant 11 semaines (Lindsay, Blagburn et al. 2002).

En conditions anaérobies, la sporulation peut être incomplète (arrêt au stade sporocyste) et produire des oocystes non infectants (Dubey, Miller et al. 1970a ; 1970b). La sporulation peut reprendre partiellement (4%) en conditions aérobies après 30 j d'anaérobiose (Dubey, Miller et al., 1970b). Expérimentalement, la sporulation est possible dans différents milieux de conservation (Dubey, Miller et al., 1970b) : 74 à 80% des oocystes développent leur infectiosité dans de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 2% ou dans du bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) à 2,5%, contre seulement 36% après sporulation dans l'eau. En conditions naturelles, la sporulation tient probablement compte de paramètres physico-chimiques beaucoup plus complexes afin qu'un maximum d'oocystes deviennent infectants. La sporulation est possible dans l'eau de mer à 24°C (eau de mer artificielle à 15 et 32 ppt) (Lindsay, Collins et al., 2003).

2.2.2. Ultrastructure

La paroi de l'oocyste sporulé est constituée, d'après Speer et al (1998), de trois couches (figure 4C) : une couche externe (couche 4 selon la nomenclature du paragraphe 2.1.5.), dense aux électrons, de 30,5 nm d'épaisseur, une couche médiane vestigiale (espace inter couches 4 et 5) peu dense aux électrons de 8-10 nm d'épaisseur, et une couche interne, moyennement dense aux électrons, de 61 nm d'épaisseur (couche 5). Un micropyle unique est réparti aléatoirement à la surface de l'oocyste sporulé (figure 4C). Sa

fonction est inconnue mais il pourrait représenter un site sensible aux actions du CO₂ et d'enzymes au cours des étapes précoces du dékystement des sporozoïtes. La paroi du sporocyste possède 2 couches distinctes avec une couche externe mince, dense aux électrons, et une couche interne plus épaisse et moins dense. La couche interne est composée de quatre plaques incurvées maintenues entre elles par quatre sutures épaisses.

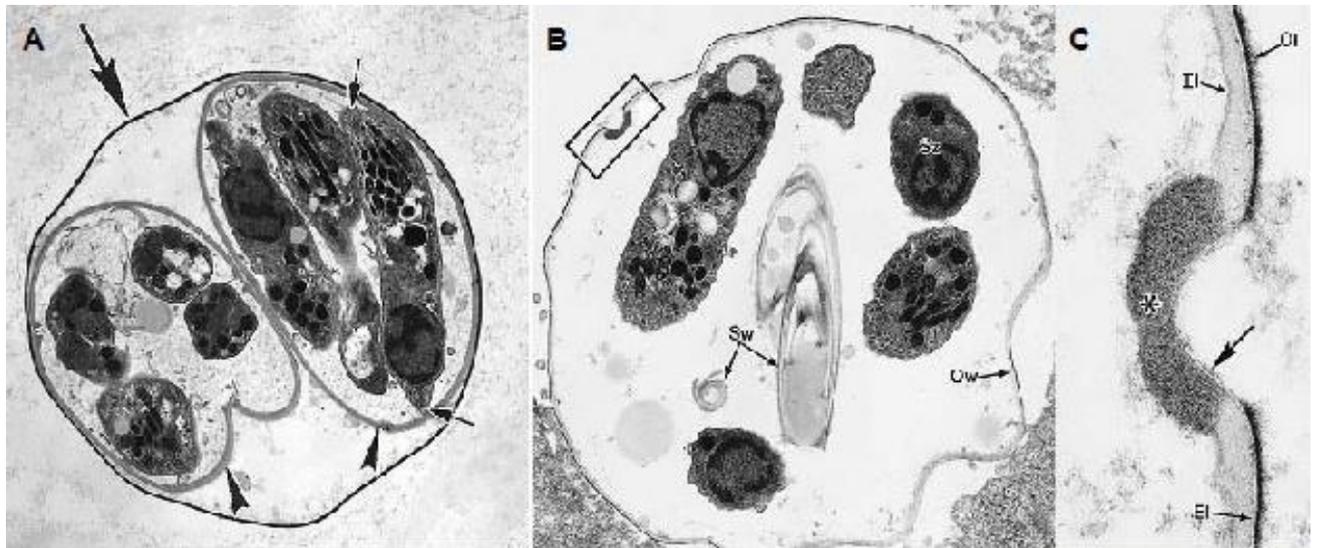


Figure 4 : Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique (Dubey, Lindsay et al., 1998 ; Speer et al., 1998). (A) Oocyste sporulé protégé par sa paroi (grande flèche) contenant deux sporocystes (têtes de flèches) renfermant chacun quatre sporozoïtes (petites flèches). (B) Étape tardive du dékystement montrant des sporozoïtes libres (Sz) et des plaques sporocystiques enroulées (Sw), protégés par la paroi de l'oocyste (Ow). (C) Détail de la paroi de l'oocyste montrant la couche 4 externe (Ol) et la couche 5 interne (Il) séparées par une couche médiane vestigiale (El). Le micropyle (*) possède une couche externe et une couche médiane amincies en prolongement de celles de l'oocyste (flèche) et une couche interne épaisse (*).

L'étude ultrastructurale du sporozoïte nécessite un dékystement préalable (Ferguson et al. 1979d). La paroi de l'oocyste est fragilisée par un traitement mécanique et/ou chimique à l'hypochlorite de sodium suivi d'une incubation sous CO₂ (Christie et al., 1978 ; Speer et al., 1998 ; Freyre et Falcón, 2004). L'action enzymatique de la trypsine et des sels biliaires provoque la rupture des sporocystes au niveau des sutures et entraîne la libération des sporozoïtes (Christie et al., 1978) (figure 4A). Les plaques forment alors des structures enroulées (figure 4B) laissant des résidus sporocystiques (granules d'amylopectine et corps lipidiques) (Christie et al., 1978 ; Speer et al., 1998). Sur le plan ultrastructural, le sporozoïte peut être différencié du tachyzoïte et du bradyzoïte par l'aspect des rhoptries en microscopie électronique (tachyzoïte : rhoptries labyrinthiques ; bradyzoïte : uniformes ; sporozoïte : uniformes et labyrinthiques), le nombre de micronèmes, et par le nombre et la taille des granules denses, des grains d'amylopectine et des inclusions lipidiques (Speer et al., 1998). Le sporozoïte de *T. gondii* ne possède pas de corps cristalloïde contrairement à celui d'*Hammondia hammondi* (Riahi, 1997).

2.2.3. Antigènes

Les antigènes du stade oocyste/sporozoïte sont moins bien connus que ceux des stades asexués, même s'il existe des antigènes communs aux différents stades évolutifs (Ferguson, 2004). Les principaux antigènes identifiés appartiennent au sporozoïte. Deux protéines de 25 et 67 kDa (Sp25 et Sp67) sont majoritaires à la surface du sporozoïte (Kasper et al., 1984 ; Kasper et Ware, 1985 ; Radke et al., 2004). Après infection par des oocystes, Sp67 et une protéine additionnelle de 190 kDa (Sp190) induisent une réponse IgM et IgG au cours de la phase aiguë puis essentiellement une réponse IgG en phase chronique (Kasper et Ware, 1985). La réponse IgM ne semble pas être dirigée contre des déterminants glycoprotéiques. Sp25 induit uniquement une réponse IgM lors de la phase aiguë. Bien que présents transitoirement dans un organisme, les oocystes expriment des protéines capables de provoquer un switch IgM/IgG, au cours de la phase chronique. D'autres protéines, notamment celles de granules denses, sont présentes dans le sporozoïte mais toutes ne sont pas mobilisées au cours de l'infection cellulaire (Tilley et al., 1997). Le profil d'expression protéique est modifié lors de la conversion en tachyzoïte (Speer et al., 1995 ; Radke et al., 2004). La connaissance des antigènes des parois de l'oocyste et du sporocyste se résume aux études suivantes :

- Ferguson et al. (2000) ont montré la présence d'une protéine MIC4-like dans les WFB1a puis dans le voile lâche entourant le macrogamète mature et l'oocyste non sporulé. Par la suite, MIC4 (61 kDa) n'est plus exprimé par l'oocyste jusqu'à la formation complète des sporozoïtes (Brecht et al. 2001). L'expression d'un antigène de micronème au cours de l'oocystogenèse est unique chez le toxoplasme mais a déjà été observée chez *Cryptosporidium parvum* (Bonnin et al. 1993).
- Deux anticorps monoclonaux spécifiques de la paroi interne de l'oocyste sporulé ont été obtenus par Kasper et al. (1984) après immunisation avec des lysats d'oocystes sporulés. Un troisième clone a montré une réactivité croisée entre la paroi, le sporozoïte et le tachyzoïte. Ces trois anticorps ne marquant pas les oocystes intacts, Kasper et al. (1984) ont conclu en l'absence de structures antigéniques dans la paroi externe.
- Récemment, la protéine putative TgOWP1, homologue des protéines de la paroi externe de l'oocyste de *Cryptosporidium parvum* (ou protéines COWP), a été identifiée dans le génome du toxoplasme (<http://www.toxodb.org>) (Templeton et al., 2004). Le séquençage de TgOWP1 met en évidence de nombreux domaines riches en cystéine et la plus grande homologie avec COWP6. L'obtention d'un anticorps monoclonal qui permettra la caractérisation de cette protéine est en cours (Aubert D. et Villena I., communication personnelle).

2.2.4. Autofluorescence

Les oocystes sporulés et non sporulés émettent une fluorescence bleue naturelle sous excitation ultraviolette (UV) (filtre d'excitation : 330-385 nm, miroir dichroïque ; 400 nm, filtre d'émission ; 420 nm) (Lindquist et al., 2003 ; Dumètre et Dardé, 2004).

Seules les parois des oocystes et des sporocystes sont fluorescentes (figure 5). Cette fluorescence naturelle est partagée par les oocystes d'autres coccidies phylogénétiquement proches de *T. gondii*, comme *Besnoitia darlingi*, *Cyclospora cayetanensis*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, *Hammondia hammondi*, *Hammondia heydorni*, *Isospora belli*, *Neospora caninum* et *Sarcocystis neurona* (Ortega et al., 1997; Berlin et al., 1998 ; Belli et al., 2003 ; Lindquist et al., 2003).

L'origine de cette autofluorescence n'est pas bien identifiée. Une étude de l'oocyste d'*Eimeria maxima* a montré l'oxydation de glycoprotéines riches en tyrosine dans les WFB, leur incorporation dans la paroi en développement, et la présence de formes oxydées de la tyrosine (dityrosine et 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA)) dans des extraits d'oocystes (Belli et al., 2003). La rigidité de la paroi est assurée par le « cross-linking » des protéines par des ponts dityrosiques et par une oxydation des protéines contenant des groupes DOPA (ou processus de « quinone tanning »). L'autofluorescence bleue des parois est la réponse à l'excitation UV de la dityrosine et dans une moindre mesure des groupes DOPA oxydés (Lerher et Fasman, 1967 ; Belli et al., 2003). L'autofluorescence et la rigidité de la paroi de l'oocyste sont donc deux propriétés liées l'une à l'autre. Il est possible que le développement de la paroi de l'oocyste de *Toxoplasma gondii* soit analogue à celui d'*E.maxima*.

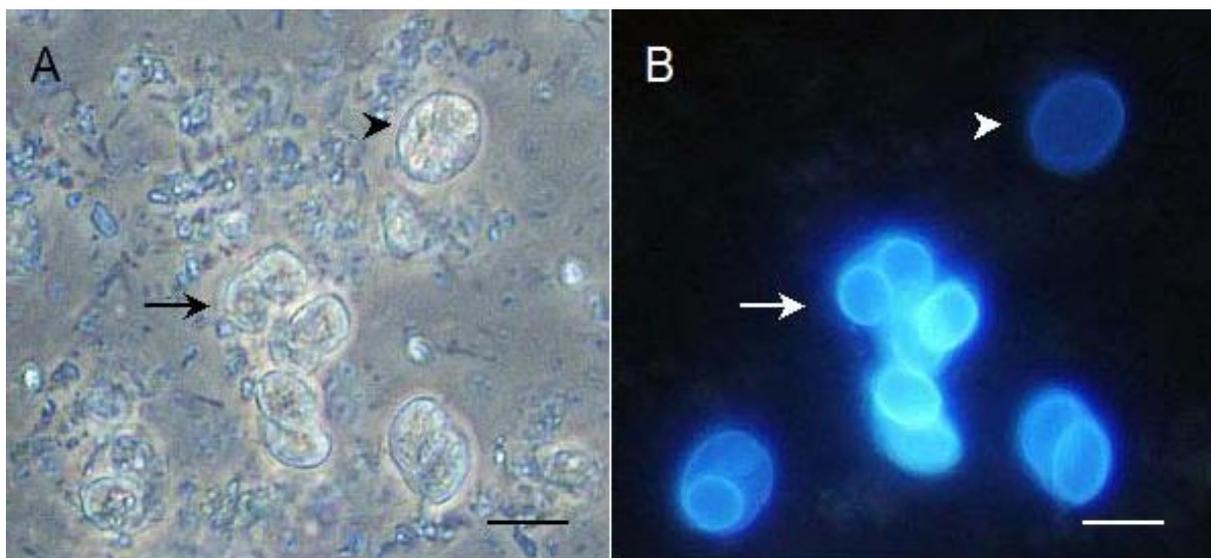


Figure 5 : Autofluorescence des oocystes non sporulés et sporulés de toxoplasme. (A)

Oocystes non sporulé (tête de flèche) et sporulés (flèche) parmi des débris fécaux (contraste de phase). (B) Une observation sous UV facilite la détection des oocystes (filtre d'excitation : 330-385 nm, miroir dichroïque : 400 nm, filtre d'émission : 420 nm) (x400, échelle = 10 µm).

3. Résistance aux conditions environnementales et aux procédés d'inactivation

Cette résistance correspond au maintien du pouvoir infectant des sporozoïtes en présence d'agents physico-chimiques d'inactivation. Elle est due à la rigidité des parois de l'oocyste et du sporocyste. Il est important d'évaluer cette résistance pour minimiser la transmission du parasite via les matrices alimentaires.

3.1. Facteurs physiques

3.1.1. Température

La résistance à la température a été testée pour différentes matrices, en conditions naturelles ou expérimentales : fèces, sol, baies, eau (potable ou non), eau de mer (tableau 1). Pour comparaison, les oocystes sporulés conservés dans une solution de H₂SO₄ à 2% à 4°C restent infectants 578 j (Dubey et Beattie, 1988) sans perte d'infectiosité au cours des douze premiers mois (Dubey, Lunney et al. 1996).

Dans l'eau, l'infectiosité est maintenue pendant 54 mois à 4°C (Dubey, 1998b) ou 548 j à 20-22°C (Hutchison, 1967). Les oocystes, sensibles à la chaleur, sont rapidement inactivés à partir de 55°C. Au contraire, une exposition constante à -21°C pendant 28 j n'empêche pas l'infection (Frenkel et Dubey, 1973). Les oocystes restent infectants après 180 j à 4 et à 24°C dans de l'eau de mer à 15 ppt (Lindsay, Collins et al. 2003).

La résistance dans les matrices solides (sol et aliments) est moins importante : les oocystes restent tout de même infectants pendant 30 à 410 j selon la température et les conditions d'expositions des suspensions (tableau 1). Les suspensions soumises aux fluctuations naturelles de température et d'exposition maintiennent leur pouvoir infectant pendant 46 j à 18 mois selon les matrices. L'impact d'une contamination fongique ou bactérienne sur la survie des oocystes n'a pas été évalué.

Température (°C)	Conditions	Durée de survie ^a	Références
En laboratoire			
-20	Eau	28 j	Frenkel et Dubey, 1973
-10/-5	Eau	106 j	Dubey, 1998b
0	Eau	13 mois	Dubey, 1998b
+4	Eau	54 mois	Dubey, 1998b
	Baies	56 j	Kniel et al. 2002
	Fèces	214-410 j ^b	Yilmaz et Hopkins, 1972
+4/+24	Eau de mer à 15 ppt	180 j	Lindsay, Collins et al. 2003
+20/+22	Eau	548 j	Hutchison, 1967
+22,5	Eau	306-410 j ^b	Yilmaz et Hopkins, 1972
	Fèces	107-306 j ^b	
+23→+29	Sols humides	117 j	Dubey, Miller et al. 1970a
+30	Eau	107 j	Dubey, 1998b
+35	Eau	32 j	Dubey, 1998b
+37	Eau	91-306 j ^b	Yilmaz et Hopkins, 1972
	Fèces	30-153 j ^b	
+40	Eau	9 j	Dubey, 1998b
+45	Eau	1 j	Dubey, 1998b
+50	Eau	30-60 min	Dubey, Miller et al. 1970a ; Dubey, 1998b
+55/+58	Eau	< 15 min	Kutičić et Wikerhauser, 1996; Dubey, 1998b

Température (°C)	Conditions	Durée de survie ^a	Références
+60/+70	Eau	< 1 min	Dubey, 1998b
En conditions naturelles			
-20→+35	Fèces dans le sol	18 mois	Frenkel et al. 1975
-6→+39	Eau	122–306 j / 153–410 j ^c	Yilmaz et Hopkins, 1972
	Fèces	46–183 j / 76–334 j ^c	
+15→+30	Fèces dans le sol	56–357 j	Frenkel et al. 1975
+20→+27	Sol humide	106 j	Ruiz et al. 1973

Tableau 1: Survie des oocystes sporulés de toxoplasme dans l'eau et les matrices solides (en italique). ^a: Durée de l'infectiosité globale de la suspension d'oocystes évaluée par inoculation à la souris. ^b: Durée de l'infectiosité globale d'une suspension découverte (sujette à la dessiccation) – durée de l'infectiosité globale d'une suspension couverte. ^c: Durée de l'infectiosité globale d'une suspension découverte – d'une suspension couverte, exposées au soleil / ou placées à l'ombre.

3.1.2. Dessiccation

Les oocystes sporulés dans des fèces de chats sont infectants 32 jours sous 100 % d'humidité à 22-26°C, 18 jours à 80%, 11 jours à 37%, et ne sont inactivés qu'après 8 jours à 0% (Frenkel et Dubey, 1972). Des suspensions pures d'oocystes sont moins résistantes (Dubey, Miller et al. 1970a ; Frenkel et Dubey, 1972). En conditions naturelles, l'exposition directe des matrices solides aux rayonnements solaires accélère la perte d'infectiosité (tableau 1) (Yilmaz et Hopkins, 1972 ; Frenkel et al. 1975).

3.1.3. Rayonnements

Les rayonnements indirectement ionisants (γ et X) sont utilisés pour améliorer la durée de conservation des aliments (Farkas, 1998). Des doses de 2 à 7 kilograys (kGy) détruisent la plupart des bactéries pathogènes non sporulées (traitement équivalent à une pasteurisation). Le pouvoir infectant des parasites présents dans la viande et le poisson est diminué à des doses de 0,1 à 10 kGy (Farkas, 1998). Seuls les effets des rayonnements γ ont été étudiés sur des baies contaminées par des oocystes de toxoplasme. Le pourcentage d'oocystes sporulés diminue avec l'augmentation de la dose d'irradiation (0,2 à 0,8 kGy) (Dubey, Thayer et al., 1998). Environ 50% des oocystes ne sporulent pas après un traitement à 0,6 kGy et les oocystes ayant réussi à sporuler n'induisent pas de toxoplasmose sérologique. Au contraire, des oocystes sporulés irradiés à 0,35 kGy sont infectants pour la souris. A des doses supérieures, l'inoculation d'oocystes sporulés irradiés entraîne un dékystement des sporozoïtes et le développement d'une réponse immunitaire, mais les sporozoïtes ne peuvent plus initier la multiplication du parasite (Dubey, Jenkis et al., 1996 ; Dubey, Thayer et al., 1998). D'autres rayonnements (UV, infrarouges, micro-ondes) utilisés dans le traitement de l'eau, la conservation ou la préparation des aliments n'ont pas été testés.

3.1.4. Hautes pressions

Un traitement des aliments par hautes pressions peut se substituer à la pasteurisation. Il est utilisé dans une gamme de 100 à 300 mégapascals (MPa) (Delacour et al., 2002). Des oocystes, exposés 1 min à des pressions comprises entre 100 et 550 Mpa, perdent leur infectiosité à partir de 340 MPa (Lindsay, Collins et al, 2004a).

3.2. Facteurs chimiques

3.2.1. Acides et bases

Plusieurs solutions acides (H_2SO_4 à 2%, $K_2Cr_2O_7$ à 2,5%) sont d'excellents milieux de sporulation et de conservation des oocystes : l'infectiosité des oocystes peut y être maintenue pendant plus d'un an à 4°C (Dubey, Miller et al. 1970a ; 1970b). Cependant, une exposition de 24 h à de fortes concentrations (>50%) en acide sulfurique et en acide nitrique inactive les oocystes (Dubey, Miller et al. 1970a). La résistance aux solutions basiques est moins importante. L'infectiosité est diminuée d'un facteur 100 après 1 h dans une solution de NaOH à 10%, d'un facteur 1000 dans une solution de NaOH à 20% (Dubey, Miller et al. 1970a). L'inactivation totale d'une suspension d'oocystes peut être obtenue après 24 h dans une solution de NaOH à 6% (Dubey et Beattie, 1988).

3.2.2. Désinfectants et détergents

La résistance à l'hypochlorite de sodium ($NaClO$) a été la plus étudiée (Dubey, Miller et al. 1970a). Si la paroi externe de l'oocyste est détruite par une solution à 5,25%, cette concentration est insuffisante pour tuer les oocystes après 30 min d'exposition. De même, une inactivation totale n'est pas obtenue après une exposition des oocystes à des concentrations de 8,3 à 12,5% pendant 30 min ou de 6% pendant 24 h. La résistance des oocystes aux concentrations de chlore habituellement utilisées pour la désinfection de l'eau potable a été évaluée récemment. Villena (2004) a montré par bioessai l'infectiosité d'une suspension de 10^3 oocystes soumis à différents procédés de chloration pendant 4 h. Ces traitements sont également inefficaces sur les oocystes de cryptosporidies, alors que l'ozonation apparaît supérieure (Corona-Vasquez et al., 2002). L'ozonation n'a pas été testée sur les oocystes de toxoplasme.

D'autres agents chimiques inactivent le toxoplasme mais leur usage domestique paraît inapproprié. Les oocystes perdent leur infectiosité après un passage dans l'ammoniaque à 28 % pendant 10 min ou après 3 h avec des concentrations à usage domestique (Frenkel et Dubey, 1972). Les oocystes sont tués également par une solution iodée contenant 7% d'iode (I_2) et 5% de iodure de potassium (KI) pendant 30 min (Frenkel et Dubey, 1972) ou dans du formol à 10% pendant 4 j (Ito et al., 1975). Les alcools ne sont pas efficaces, hormis l'éthanol pur (99 %) après 24 heures de contact (Ito et al. 1975). La résistance aux détergents est importante puisque des solutions contenant 0,1% de polyoxyéthylènesorbitan monoléate (Tween 80) ou de sodium dodécyl sulfate (SDS), ne tuent pas les oocystes après 24 h d'exposition (Dubey, Miller et al. 1970a).

3.2.3. Enzymes

Les oocystes résistent aux attaques enzymatiques du tube digestif jusqu'au dékystement des sporozoïtes. Expérimentalement, une solution pepsique (activité biologique 1:10000) à 1% (pH 1,3) ou une solution trypsique (activité biologique 1:250) à 0,5% (pH 7,6) diminue d'un facteur 10 l'infectiosité des oocystes après une exposition de 1 h à 37°C (Dubey, Miller et al., 1970a). Des oocystes incubés dans des solutions de chymotrypsine, streptokinase, pronase, acétylcystéine et papaine restent infectants, sans autre précision, après une exposition de 1 h à 37°C (Dubey, Miller et al. 1970a). L'action enzymatique seule, en l'absence d'un stimulus mécanique, semble ainsi avoir peu d'effets sur la paroi de l'oocyste de toxoplasme (Freyre et Falcon, 2004). Des résistances similaires sont rapportées pour les oocystes d'*Eimeria tenella* (Ryley, 1973) et de *Cryptosporidium parvum* (Harris et Petry, 1999).

4. Importance des oocystes dans la transmission de la toxoplasmose

4.1. Réservoir d'émission

4.1.1. Chat domestique (*Felis catus*)

La population de chats domestiques (*Felis catus*) est estimée à 8 millions en France et à 400 millions dans le monde (Legay, 1986). Les toxoplasmoses félines symptomatiques sont exceptionnelles (Dubey et Beattie, 1988). La transmission verticale ne semble pas jouer de rôle épidémiologique important (Dubey, 1977). La multiplicité des tests sérologiques utilisés dans les différentes études de séroprévalence rend difficile une comparaison des données (Tenter et al., 2000). La séroprévalence varie avec l'âge, le sexe et le mode de vie des chats. Les anticorps sont généralement détectés après le sevrage (>6-10 semaines). Les mâles, plus territoriaux et plus enclins à chasser que les femelles, sont les plus exposés. Les séroprévalences élevées (>55%) sont retrouvées parmi les chats qui évitent tout contact avec l'homme (Dubey, 1973 ; Dubey, Saville et al. 2002) ou qui vivent dans des zones de transmission toxoplasmique importante (Dubey, Navarro et al. 2004). Au contraire, les chats vivant en intérieur et nourris avec une alimentation industrielle sont moins infectés (<40%). Quelque soit le mode de vie des chats, la séroprévalence est plus faible en Asie (6-33%) qu'ailleurs (Tenter et al. 2000). En France, la séroprévalence est d'environ 40 à 60% (Pestre-Alexandre et al., 1984 ; Cabannes et al., 1997). La quantité d'oocystes émis semble plus importante chez les jeunes mâles (<1 an) (Dubey, Hoover et al., 1977). La fin de l'émission correspond au développement d'une immunité protégeant des réinfections (Dubey et Frenkel, 1972 ; Sheffield et Melton, 1976 ; Frenkel et Smith, 1982 ; Davis et Dubey, 1995). Pourtant, une réexcrétion moins importante d'oocystes a été montrée expérimentalement chez des chats infectés puis réinfectés par une souche de génotype différent de la première (Dubey et Frenkel, 1974 ; Dubey, 1995). Une dénutrition, une corticothérapie (Dubey et Frenkel, 1974), et des infections parasitaires (Dubey, 1976) peuvent aussi favoriser des réexcrétions. Étant donné la brièveté de l'émission des oocystes dans la vie d'un chat (2-3 semaines) et la rareté des réinfections, l'examen parasitologique des selles n'est pas une technique fiable de dépistage de la toxoplasmose féline. Par cette technique, seulement 2% des chats sont trouvés

excréteurs à un moment donné (Dubey et Beattie, 1988 ; Jackson et Hutchison, 1989 ; Dubey, 2004).

4.1.2. Félines sauvages

Dix-sept espèces de félines sauvages sont connues comme hôtes définitifs du toxoplasme. (Lukesova et Literak, 1998). Expérimentalement, avec des souches de toxoplasme provenant du cycle domestique, le pourcentage d'animaux excréteurs est plus faible et la quantité émise d'oocystes est moins importante que pour des chats placés dans les mêmes conditions (Jewell et al., 1972 ; Miller et al., 1972). La séroprévalence de la toxoplasmose a été surtout étudiée parmi les populations sauvages de félines américains (Aramini et al. 1998 ; Labelle et al. 2001 ; Zarnke et al. 2001 ; Kikuchi et al., 2004 ; Riley et al., 2004) ou chez des animaux captifs (Zhang et al., 2000 ; Silva et al., 2001 ; Kikuchi et al., 2004) Comme chez le chat domestique, la séroprévalence varie en fonction de l'âge et du sexe, les mâles adultes étant les plus infectés (Kikuchi et al., 2004). Elle est plus élevée en régions intertropicales (50-75%) (Silva et al. 2001 ; Kikuchi et al. 2004) qu'en milieu arctique (15%) (Zarnke et al. 2001). Le rôle direct des félines sauvages dans l'épidémiologie de la toxoplasmose humaine est mal connu. Les oocystes qu'ils émettent pourraient être à l'origine de certains cas humains de toxoplasmoses sévères (Benenson et al. 1982 ; Aramini et al. 1998 ; 1999 ; Carme et al. 2002).

4.2. Dissémination et prévalence dans les matrices environnementales

4.2.1. Sol

L'habitude des félines d'enterrer leurs fèces permet une contamination des dix premiers centimètres de la surface du sol et empêche une dessiccation des oocystes (Frenkel et al., 1975 ; Aramini et al., 1999). Des oocystes ont ainsi été isolés plus volontiers de sols humides et ombragés (Ruiz et al. 1973). Les eaux de ruissellement et la microfaune du sol favorisent la dissémination du parasite. Les vers de terre, maintenus au contact de sols contaminés, sont capables de transmettre l'infection (Frenkel et al. 1975 ; Ruiz et Frenkel, 1980 ; Bettiol et al. 2000). En surface, d'autres invertébrés (cafards, mouches) et leurs fèces peuvent également être porteurs ou contenir des oocystes infectants (Wallace, 1973 ; Frenkel et al. 1975 ; Smith et Frenkel, 1978). Des oocystes ont été isolés du sol après des cas groupés de toxoplasmose au Royaume-Uni et au Brésil (Fleck et al., 1972 ; Coutinho et al., 1982). En dehors de tout contexte épidémique, des bio-essais positifs chez la souris ont été obtenus à partir de sols naturellement contaminés (Dubey et Beattie, 1988 ; Ruiz et al. 1973 ; Dubey, Weigel et al. 1995 ; Frenkel et al. 1995).

4.2.2. Eau

Le drainage des sols permet une contamination des eaux de surface et souterraines, des eaux ressources destinées à la consommation et aux loisirs, puis du milieu marin (Bowie et al., 1997 ; Miller et al., 2002). Au regard de la densité des oocystes (1,104-1,140 ; Dubey, Miller et al., 1970b) et de leur interaction probable avec des particules sédimentaires, les oocystes pourraient se localiser plutôt au fond des eaux stagnantes. Une seule étude a mis

en évidence des toxoplasmes (sous forme d'ADN) dans 10/139 échantillons d'eaux de consommation, de surface ou souterraines, prélevés en dehors de tout contexte épidémique (Villena et al., 2004).

4.2.3. Végétaux

La présence d'oocystes sur les fruits et légumes destinés à la consommation n'a jamais été recherchée. Expérimentalement, les oocystes restent infectants pendant 8 semaines au contact de baies (framboises, myrtilles) conservées à 4°C (Kniel et al., 2002). Ces fruits ainsi que d'autres végétaux peuvent être une source d'infection par *Cyclospora cayetanensis*, coccidie proche du toxoplasme (revu par Shields et Olson, 2003). Il est probable que des oocystes adhérant aux végétaux restent infectants aussi longtemps que les conditions de température et d'humidité optimales pour leur survie sont maintenues. Leur ingestion par un hôte est alors possible avant la décomposition des végétaux. Des oocystes de toxoplasme ont été isolés par bio-essai sur de la nourriture de porc (Dubey, Weigel et al, 1995).

4.3. Exemples d'espèces animales soumises à l'infection par les oocystes

Un seul oocyste peut induire une toxoplasmose chez la souris (Dubey, Speer et al., 1997) ou chez le porc (Dubey, Lunney et al., 1996), mais certaines espèces y sont plus résistantes : chat, rat, bovins (Dubey et Beattie, 1988 ; Dubey, 1996a ; 1996b). L'ingestion d'oocystes est un mode majeur de contamination pour un grand nombre de mammifères et d'oiseaux (Tenter et al., 2000). Il est impossible de faire une présentation exhaustive du réservoir animal soumis à l'infection par les oocystes. Les quatre exemples suivants montrent que certaines espèces, de par leur écologie, peuvent servir de bio-indicateurs de la présence d'oocystes infectants dans l'eau et le sol.

4.3.1. Rongeurs

Les rongeurs ne semblent réellement constituer un réservoir important d'infection pour le chat domestique que dans les zones urbaines ou rurales pour lesquelles un cycle parasitaire perdure (Eyles et al., 1959 ; Dubey, Weigel et al., 1995 ; Frenkel et al., 1995 ; Lehmann et al., 2003). Les données de séroprévalence montre que la contamination des rongeurs dépend fortement du degré d'exposition aux oocystes. L'exposition est maximale près des bâtiments de fermes qui attirent rongeurs et chats (Lehmann et al., 2003). Cependant, cette exposition ne serait pas nécessaire pour maintenir une prévalence élevée. Celle-ci s'expliquerait par une transmission verticale du parasite sur plusieurs générations (Owen et Trees, 1998 ; Marshall et al., 2004). Cette hypothèse nécessite des investigations supplémentaires, pour expliquer l'importance de ce mode de transmission dans la toxoplasmose.

4.3.2. Oiseaux

Par le phénomène de migration, les oiseaux sont aptes à transmettre le toxoplasme sur des distances géographiques importantes, même si la prévalence du parasite chez les espèces migratrices reste peu connue (Dubey, 2002b). Les espèces sédentaires qui ont été domestiquées (volailles) sont utilisées comme bio-indicateurs d'une contamination

tellurique par les oocystes, surtout dans les pays où les conditions climatiques sont très favorables à la survie des oocystes (Da Silva et al., 2003). Des séroprévalences élevées ont été rapportées dans des élevages traditionnels au Brésil (39 à 65,2% selon les régions) (Dubey, Graham et al., 2002, Dubey, Graham et al., 2003a, Dubey, Navarro et al., 2003 ; Da Silva et al., 2003), dans le nord de l'Argentine (65,5% ; Dubey, Venturini et al., 2003), en Israël (42,2% ; Dubey, Salant et al., 2004), en Égypte (40,4% ; Dubey, Graham et al., 2003b) et en République Démocratique du Congo (50,0% ; Dubey, Karhemere et al., 2005). Au contraire, 6,2% et 16,9% de poulets séropositifs sont rencontrés respectivement au Mexique (Dubey, Morales et al., 2004) et aux Etats-Unis (Dubey, Graham et al., 2003c). La séroprévalence en France n'est pas connue. La fréquence de la contamination de la volaille domestique pourrait représenter un risque potentiel pour l'homme. Cependant, les kystes sont localisés préférentiellement dans le cœur et le cerveau, puis dans les viscères et dans les muscles (Biancifiiori et al. 1986 ; Dubey, Ruff et al., 1993 ; Kaneto et al., 1997, Sedlak et al., 2004).

4.3.3. Ovins

Le rôle épidémiologique des ovins est important dans la transmission du parasite à l'homme car ils sont les animaux de boucherie les plus infectés (Tenter et al., 2000). Les données disponibles sont surtout sérologiques. La séroprévalence varie de moins de 5% au Zimbabwe, Pakistan et en Croatie, à plus de 80% en Turquie et en France (revue par Tenter et al., 2000). En France, huit enquêtes ont été réalisées dans différentes régions entre 1960 et 1997 (tableau 2). Les séroprévalences sont comprises entre 15 et 92%.

Région	Technique °a	Nombre	Séroprévalence (%)	Référence
Alsace	IFA	180	31	Callot et al., 1970
Anjou	IHA	60	15	Chabasse et al., 1978
Bretagne	IHA	609	36	Doby et Deunff, 1984
Côte d'Or	IFA	583	72	Campana-Rouget et al., 1975
Limousin	DT	120	36	Pestre et al., 1962
Paris	DT	165	72	Guillot et Desmonts, 1960
Vendée	IHA	236	22	Himy-Dahan et al., 1980
Aquitaine	IFA	642	92	Cabannes et al., 1997

Tableau 2 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez le mouton en France. °a : IFA, immunofluorescence; DT : Dye test ; IHA : hémagglutination indirecte

Responsable de la contamination horizontale, un chat infecté déféquant dans 10 tonnes de céréales peut y déposer plusieurs doses infectantes d'oocystes par kilogramme de grain (McColgan et al., 1988). La présence journalière de chatons dans les bergeries est un facteur de risque important de contamination (Skjerve et al., 1998). L'élevage extensif et un broutage ras qui favorisent l'ingestion d'oocystes, expliquent également des prévalences élevées (Tenter et al., 2000). Une transmission verticale brebis/agneaux sur plusieurs générations pourrait maintenir une prévalence élevée en dehors de l'intervention du chat (Duncanson et al. (2001). Cette hypothèse n'est pas encore vérifiée.

La gravité de la toxoplasmose congénitale dépend de la période de contamination au cours de la gestation (d'une durée totale de 150 j). Parmi les agneaux infectés non viables, 35% meurent avant le terme, 60% à la naissance et 5% quelques jours après (Dubey et Beattie, 1988). Les contaminations tardives donnent des agneaux infectés mais viables. Le cerveau et le placenta sont les organes les plus parasités (Dubey et Beattie, 1988 ; Owen et Trees, 1999 ; Duncanson et al., 2001 ; Hurtado et al., 2001). Habituellement, il n'y a pas de manifestations cliniques chez les brebis, l'éleveur n'est pas alarmé et les avortons sont rarement soumis à une recherche diagnostique. En Suisse, 19% des avortements constatés dans la région de Zurich entre 1996 et 1998 sont dus au toxoplasme qui représente la seconde étiologie après la chlamydie (Chanton-Greutmann et al., 2002). Ce pourcentage est de 11% en Sardaigne (Masala et al., 2003) et atteint 23% en Espagne (Pereira Bueno et al., 2004). Une incidence globale de 12% a été retenue par Dubey et Beattie (1988). La toxoplasmose congénitale ovine peut ainsi entraîner des pertes économiques importantes pour les éleveurs (Freyre et al., 1997). La prévalence parasitaire chez les animaux destinés à la consommation est peu connue. Des données anciennes montrent une prévalence de 2,8% à 67,6% dans différents pays (Dubey et Beattie, 1988). Elle peut varier selon les méthodes utilisées, l'inoculation à la souris pouvant être supérieure aux techniques de biologie moléculaire (Vieira da Silva et Langoni, 2001). Les chances d'isoler le parasite augmentent généralement pour des titres élevés en anticorps (Dubey et Beattie, 1988). Les organes les plus parasités sont le cerveau, le cœur, le diaphragme et les muscles squelettiques (Dubey et Sharma, 1980 ; Dubey et Beattie, 1988 ; Esteban-Redondo et Innes, 1998, Esteban-Redondo et al., 1999). Deux études récentes ont évalué par PCR la prévalence du toxoplasme dans de la viande d'agneau : 6/9 prélèvements sont trouvés positifs par Aspinall et al. (2002) en Angleterre alors que seulement 9/150 sont positifs dans la région de Berne par la même technique (Wyss et al., 2000). En France, l'importance de la toxoplasmose ovine demande une réévaluation notamment pour déterminer les facteurs de risque liés à la consommation d'animaux infectés.

4.3.4. Mammifères marins

Des séroprévalences élevées et des cas de toxoplasmoses sévères ont été rapportés chez plusieurs espèces de mammifères marins (revus par Dubey et Beattie, 1988 ; Dubey, Zarnke et al., 2003a ; Fayer et al., 2004) notamment chez les loutres de mer (Cole et al., 2000 ; Miller et al., 2002 ; 2004). La prédation sur d'autres homéothermes étant restreinte à

quelques espèces, les principaux modes de contamination sont l'ingestion d'oocystes avec l'eau de mer et la prédation sur des mollusques qui concentrent les oocystes dans leurs tissus et peuvent servir d'hôtes paraténiques au parasite (Fayer et al., 2004). Expérimentalement, les huîtres et les moules immergées dans l'eau de mer retiennent des oocystes infectants pendant 85 j (Lindsay, Phelps et al., 2001 ; Lindsay, Collins et al., 2004b ; Arkush et al., 2003). Ces mollusques, et peut-être d'autres, sont potentiellement des sources d'infection toxoplasmique pour les animaux et pour l'homme de la même façon que les oocystes de *Cryptosporidium parvum* (Fayer et al., 1998 ; Freire-Santos et al., 2000b). Le lessivage des sols côtiers et les effluents continentaux sont les portes d'entrée des oocystes dans le milieu marin (Miller et al., 2002). La salinité a peu d'effets sur l'infectiosité des oocystes (Lindsay, Collins et al., 2003).

4.4. Le rôle des oocystes dans l'infection humaine

En l'absence d'un sérodiagnostic différentiel, il est impossible de déterminer quel stade évolutif est à l'origine d'une toxoplasmose. La part des oocystes est donc inconnue même s'il existe des évidences épidémiologiques de toxoplasmose due à l'ingestion d'oocystes.

4.4.1. Facteurs de risque associés aux oocystes

Les facteurs de risque associés aux oocystes diffèrent selon les études. Le degré d'exposition aux oocystes varie en fonction des zones géographiques, du climat qui assure la plus ou moins grande survie des oocystes dans le sol, des habitudes culinaires et d'autres facteurs intervenant dans le mode de vie. Malgré des résultats hétérogènes, les principaux facteurs de risque sont le contact avec le sol (jardinage sans gants) (Baril et al., 1999 ; Weigel et al., 1999 ; Cook et al., 2000) et la consommation fréquente de crudités par des femmes qui ne les avaient pas préparés elles-mêmes (Baril et al., 1999). La consommation d'eau non traitée est un facteur de risque dans des pays où le traitement de l'eau est peu développé (comme dans certaines régions du Brésil) (Bahia-Oliveira et al., 2003). Des cas de toxoplasmoses chez des végétariens laissent penser à l'ingestion de végétaux contaminés (Hall et al., 1999 ; Roghmann et al., 1999 ; Carme et al., 2002). La proximité des chats n'est pas toujours retenue comme facteur de risque (Cook et al., 2000 ; Bahia-Oliveira et al., 2003). De façon indirecte, les oocystes constituent également un risque par la contamination des animaux de boucherie.

4.4.2. Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes

Plusieurs épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes ont montré que la dissémination du parasite à partir de quelques félins excréteurs était assez efficace pour infecter un nombre significatif d'individus (tableau 3). Ceci est d'autant plus vrai pour les épidémies hydriques, au cours desquelles de faibles volumes d'eau peuvent être vecteurs de plusieurs doses infectantes d'oocystes. À l'opposé, une contamination tellurique est plutôt à l'origine de petites épidémies souvent familiales. Dans la plupart des épidémies documentées, les adénopathies sont les principales manifestations cliniques observées. Des formes plus sévères ont été observées chez des sujets

immunocompétents au Canada (Bowie et al., 1997), au Brésil (Taverne, 2002) et au Surinam (Demar et al., 2005). Les cas mortels sont exceptionnels (Demar et al., 2005). A part deux études ayant associé la présence d’oocystes de toxoplasme à des cas groupés de toxoplasmoses (tableau 3), les sources de contamination restent difficile à identifier. Les enquêtes épidémiologiques montrent toujours la présence de chats ou de félins sauvages au moment de la contamination. L’épidémie canadienne est de loin la plus documentée car elle est la première à avoir été associée à l’ingestion d’eau de boisson contaminée par le toxoplasme (Bowie et al., 1997 ; Isaac-Renton et al., 1998 ; Aramini et al., 1998 ; 1999). Deux paramètres semblent avoir favorisé cette épidémie : (i) la contamination d’un des deux réservoirs alimentant la région de Victoria par des oocystes émis par les chats et couguars endémiques (Aramini et al., 1998 ; 1999), et (ii) le traitement de l’eau par chloration qui a eu peu d’effet sur l’infectiosité des oocystes (Bowie et al., 1997 ; Isaac-Renton et al., 1998). L’absence d’un traitement approprié de l’eau de boisson serait également à l’origine de deux épidémies de toxoplasmoses dans la ville de Santa Isabella do Ivai (Paraná, Brésil) (Taverne, 2002 ; Dubey, Navarro et al., 2004 ; Holland, 2003), et dans un village surinamien (Demar et al., 2005).

Pays	Année	Source de Contamination	Nombre de cas	Expression clinique	Oocystes isolés	Référence
Royaume-Uni	1972	Bac à sable	2 (familiaux)	1 forme symptomatique 1 forme asymptomatique (sérologie évolutive)	Oui °b	Fleck et al., 1972
USA	1976	Sol	10 (familiaux)	7 formes symptomatiques aiguës (dont une atteinte neurologique sévère) 3 formes asymptomatiques (sérologie évolutive)	Non	Stagno et al., 1980
USA	1977	Poussière Ingérée	37	35 formes symptomatiques aiguës 2 formes asymptomatiques	Non	Teutsch et al., 1979
USA	1979	Contact avec des chatons infectés	9 (familiaux)	6 symptomatiques aiguës 3 formes asymptomatiques	Non	Shenep et al., 1984
Panama	1979	Eau de surface	35	32 formes symptomatiques aiguës 3 formes asymptomatiques	Non	Benenson et al., 1982

Pays	Année	Source de Contamination	Nombre de cas	Expression clinique	Oocystes isolés	Référence
Brésil	1982	Sol	NS °a	NS	Oui °b	Coutinho et al., 1982
Canada	1995	Eau de boisson	100 (2894-7718 estimés)	63 formes symptomatiques aiguës (dont 19 chorioretinites) 37 femmes enceintes asymptomatiques 2 formes asymptomatiques	Non	Bowie et al., 1997
Brésil	2002	Eau de boisson	290	NS	Non	Taverne, 2002
Surinam	2005	Eau de boisson	11	9 formes symptomatiques aiguës 2 formes congénitales	Non	Demar et al., 2005

Tableau 3 : Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes (en gras, les cas d'origine hydrique). °a : NS, non spécifié. °b : Oocystes isolés par inoculation à la souris d'échantillons de sol ou d'eau.

4.5. Association avec des génotypes particuliers

4.5.1. Diversité génétique du toxoplasme : outils d'analyse et biais de sélection

Cette diversité peut être analysée par plusieurs techniques de typage faisant appel à des marqueurs phénotypiques ou génotypiques : analyse de l'expression d'iso-enzymes (Dardé et al., 1992), PCR-RFLP d'un ou plusieurs gènes codant pour des antigènes du parasite (ex : SAG2, codant pour un antigène de surface du tachyzoïte) (Howe et Sibley, 1995), analyse de microsatellites polymorphes présents dans le génome du toxoplasme (Blackston et al., 2001 ; Ajzenberg et al., 2002a ; 2005 ; 2010). Un typage génétique est d'autant plus informatif que les marqueurs utilisés sont suffisamment polymorphes et leur nombre important. La combinaison de plusieurs marqueurs (typage multilocus) permet ainsi de détecter des recombinaisons alléliques, qui ne sont pas révélées avec un seul marqueur (typage unilocus). Les isolats connus de toxoplasme proviennent essentiellement d'Europe et des Etats-Unis, de toxoplasmoses humaines ou d'animaux domestiques. Ces isolats ne reflètent donc pas du tout la diversité zoologique et géographique des hôtes du parasite. La sélection des isolats en fonction du type de toxoplasme introduit un biais supplémentaire. Le parasite est habituellement isolé au cours de toxoplasmoses symptomatiques alors que les formes asymptomatiques sont prépondérantes dans la maladie.

4.5.2. Structure génétique de T. gondii

Les analyses multilocus sur des isolats nord-américains ou européens montrent que 95% des isolats connus appartiennent à 3 génotypes dits « classiques » (I, II, et III) (Dardé et al., 1992 ; Howe et Sibley, 1995 ; Ajzenberg et al., 2002a). Ils sont considérés comme trois lignées clonales qui seraient apparues il y a 10 000 ans avec la domestication animale (Su et al., 2003). Les génotypes recombinants (combinaison des allèles classiques : I/II, I/III, II/III, I/II/III) et les génotypes atypiques (combinaison partielle ou totale d'allèles non I, II ou III) représentent les 5% restants (Ajzenberg et al., 2004). Les principales caractéristiques biologiques et épidémiologiques des génotypes de toxoplasme sont résumées dans le tableau

4.

<p><u>Type I</u> Rarement isolé (10% des collections d'isolats) Origine principalement humaine Europe, Etats-Unis, Amérique du Sud Comportement in vivo : virulence importante chez la souris (DL100<10 tachyzoïtes) Comportement in vitro : fort taux de multiplication, interconversion tachyzoïte ↔ bradyzoïte réduite</p>
<p><u>Type II</u> 80% des collections d'isolats Origine humaine et animale (domestique et sauvage) Europe, Etats-Unis Comportement in vivo : avirulence, infection chronique chez la souris avec persistance de kystes tissulaires Comportement in vitro : faible taux de multiplication, interconversion tachyzoïte-bradyzoïte avec formation de kystes en culture cellulaire</p>
<p><u>Type III,</u> génotypes recombinants et génotypes atypiques Rarement isolé Origine humaine (association avec des toxoplasmoses souvent sévères) Origine animale (hôtes sauvages inhabituels) Zones géographiques peu étudiées (régions intertropicales +++) Comportement in vivo : virulence intermédiaire entre types I et II Comportement in vitro : peu étudié</p>

Tableau 4 : Principales caractéristiques biologiques et épidémiologiques des génotypes de T. gondii (d'après Dardé, 2004).

4.5.3. Quels génotypes circulent dans l'environnement ?

Type I

Les isolats d'origine animale, identifiés comme type I par typage multilocus, sont peu nombreux. Les isolats CT-1 et GT-1, respectivement d'origine bovine et caprine, démontrent

la circulation d'oocystes de type I dans l'environnement (Dubey, 1980 ; Dubey, 1992). La découverte récente d'une forte proportion de « type I » après typage unilocus (PCR-RFLP SAG2) d'isolats de mouton (Fuentes et al., 2004), de poulet (Dubey, Graham et al., 2002 ; Dubey, Graham, et al., 2003a ; Dubey, Navarro, et al. 2003 ; Dubey, Venturini, et al., 2003 ; Dubey, Lévy et al., 2004 ; Dubey, Morales, et al., 2004 ; Dubey, Karhemere et al., 2005) et dans des produits de boucherie (Aspinall et al., 2002) demande à être confirmée par des études multilocus.

Types II et III

Ces deux types sont majoritaires en Europe et aux États-Unis chez les animaux domestiques et sauvages : félins (Jungersen et al., 2002 ; Dubey, Navarro et al., 2004 ; Dubey, Graham et al., 2004 ; Montoya et al., 2004), animaux de boucherie (ovins, porcins et poulets) (Howe et Sibley, 1995 ; Mondragon et al., 1998 ; Owen et Trees 1999 ; Jungersen et al., 2002 ; Lehmann et al., 2003 ; Dubey, Graham et al., 2003c ; Dubey, Edelhofer et al., 2005) et gibier (Dubey, Graham et al., 2004 ; Villena I, communication personnelle).

Types recombinants ou atypiques

Les génotypes recombinants ou atypiques proviennent essentiellement de régions faiblement anthropisées, peu étudiées jusqu'à présent (zone intertropicale en particulier), et/ou sont isolés d'hôtes inhabituels asymptomatiques (animaux sauvages) : loutre de mer (Cole et al., 2000 ; Miller et al., 2004), ours et cerf (Howe et Sibley, 1995). Chez l'homme, de tels génotypes ont toujours été associés à des toxoplasmoses symptomatiques sévères (Bossi et al., 1998 ; Dardé et al., 1998 ; Grigg et al., 2001 ; Carme et al., 2002 ; Ghosn et al., 2003 ; Ajzenberg et al., 2004 ; Demar et al., 2005). En conditions naturelles, un génotype recombinant ou atypique a été isolé à partir d'oocystes émis par un couguar vivant dans la région de Victoria, un an après la survenue d'une épidémie de toxoplasmoses aiguës dans la même région (Aramini et al., 1998 ; 1999 ; Lehmann et al., 2000). Ces génotypes recombinants ou atypiques semblent donc circuler dans des cycles parasites où l'homme intervient rarement et de façon accidentelle. A l'intérieur de ces cycles sauvages, les échanges sexuels pourraient prédominer sur une transmission clonale des trois génotypes classiques. Au contraire, il semble que les génotypes I, II et III, bien adaptés à un cycle entre l'homme et les animaux domestiques, se soient propagés de manière clonale (Ajzenberg et al. 2004 ; Lehmann et al. 2004).

En conclusion, les types II et III sont prépondérants dans les réservoirs du parasite. Ceci n'est vérifié qu'en Europe et aux Etats-Unis, surtout pour les animaux domestiques. L'analyse d'isolats provenant d'animaux sauvages et de zones géographiques peu étudiées jusqu'à présent permettrait de redéfinir la prévalence de chaque génotype.

5. Méthodes de détection des oocystes

5.1. Stratégies d'échantillonnage

La recherche d'oocystes dans un lieu donné est soumise à trois critères principaux: (i) la présence d'un nombre suffisant de chats pour y maintenir un cycle parasite avec leurs

proies, (ii) des conditions climatiques favorisant la persistance d'oocystes infectants, (iii) l'accessibilité des hôtes intermédiaires aux matrices contaminées.

En milieu rural, les lieux rassemblant ces critères sont les réserves d'aliments qui attirent rongeurs et chats dans les bâtiments d'élevage. Elles ont été retenues comme source d'infection dans des élevages porcins aux États-Unis (Dubey, Weigel et al., 1995). Les oocystes sont également à rechercher autour des bâtiments d'élevage et des habitations (potagers), près des points d'eau, dans les prairies humides exposées au drainage des sols, dans les fossés. En milieu urbain, les jardins publics (aires de jeux) et particuliers (potagers), et d'une façon générale les lieux ombragés aux sols meubles et humides semblent propices.

La filtration d'eaux de surface stagnantes est préférable à celle d'eaux courantes. Des recherches ponctuelles dans l'eau potable sont possibles en fonction du type de traitement et de l'état d'entretien du réseau de distribution. Il ne doit pas exister dans la plupart des cas de saisonnalité marquée pour la détection des oocystes dans les eaux car les chats peuvent s'infecter tout au long de l'année et les oocystes sont assez résistants aux variations climatiques annuelles. Néanmoins, les périodes de fortes précipitations qui entraînent un lessivage des sols souillés ont déjà été associées à des cas de toxoplasmose chez l'homme ou l'animal (Bowie et al., 1997 ; Miller et al., 2002). Une source de contamination est rarement identifiée en dehors de tout contexte épidémique. Après une épidémie, la recherche des oocystes doit être rapide, car ils peuvent disparaître de la source de contamination pendant le délai d'apparition des premiers signes cliniques (Teutsch et al., 1979 ; Stagno et al., 1980 ; Shenep et al., 1984 ; Isaac-Renton et al., 1998).

5.2. Détection dans l'eau

Les méthodes de recherche du toxoplasme dans l'eau ressemblent à celles développées pour les oocystes de *Cryptosporidium parvum* et les kystes de *Giardia intestinalis* (Zarlenga et Trout, 2004). Étant donné une plus faible densité des toxoplasmes dans un échantillon pris aléatoirement, l'analyse devrait porter, si possible, sur un volume d'eau important (50 à 100 L).

5.2.1. Concentration

Trois méthodes sont utilisées selon le volume d'eau à concentrer : la filtration, la floculation et la centrifugation.

5.2.1.1. Filtration

Isaac-Renton et al. (1998) et Villena et al. (2004) ont évalué des cartouches, respectivement en acrylique tissé et en polyéthylène sulfoné (Gelman Envirochek Standard (GES) ou High-Volume (GEHV)), qui permettent la filtration de volumes plus importants (500-1000 L) et plus turbides que des membranes classiques, en cellulose ou en polycarbonate. Les GES et GEHV sont maintenant recommandés pour la détection normalisée de *C. parvum* et de *G. intestinalis* (AFNOR, 2001 ; USEPA, 2001) car elles ont une capacité de filtration importante, et leur conception facilite l'élution des protozoaires, en toute sécurité (McCuin et

Clancy, 2003 ; Wohlsen et al., 2004). Leur porosité d'1 μm permet la capture des oocystes de toxoplasme avec une sensibilité théorique de 1 à 10 oocystes / litre d'eau distillée pour 100 L filtrés (Villena et al., 2004 et Villena, 2004). Ces auteurs ont montré que la sensibilité diminue quand la turbidité (exprimée en NTU) augmente, sans savoir si cela est dû à la filtration ou aux étapes ultérieures d'éluion, de purification ou de mise en évidence des oocystes (Villena et al., 2004). Une diminution similaire des pourcentages de récupération des oocystes de cryptosporidies et des kystes de *Giardia* peut être corrélée à la turbidité. La perte des protozoaires a lieu surtout pendant les étapes de filtration et d'éluion : 40 à 50% dans des eaux peu turbides (11 NTU) et jusqu'à 99% pour les *Giardia* à 99 NTU alors que 35% des cryptosporidies sont encore récupérés à cette turbidité (DiGiorgio et al., 2002). Dans une autre étude, Simmons et al. (2001) montrent une perte moyenne de cryptosporidies plus importante encore (85%) dans des eaux de surface d'une turbidité moyenne de 14,9 NTU. L'éluion des oocystes est une étape importante et son efficacité dépend de la turbidité du prélèvement, du type de filtre et de la méthode choisie (Musial et al., 1987 ; LeChevallier et al., 1995 ; Nieminski et al., 1995 ; Inoue et al., 2003). Les oocystes piégés par le filtre sont élués avec des solutions détergentes qui rompent les interactions hydrophobes entre les oocystes, les particules sédimentaires et les fibres du filtre (Musial et al., 1987). La sonication du culot après centrifugation de l'éluât semble améliorer la séparation des oocystes de cryptosporidies (Musial et al., 1987). La normalisation des procédés a conduit à l'utilisation de solutions salines types PBS supplémentées en détergents comme le laureth-12 ou le Tween-80 (AFNOR, 2001 ; USEPA, 2001). Malgré leur caractère dispersant, la force ionique relativement élevée du PBS (164 mM) entraîne plutôt l'agrégation des oocystes aux débris (Davies et al., 2003). L'utilisation de solutions contenant des agents dispersants (EDTA, pyrophosphate de sodium) augmente significativement le pourcentage moyen de récupération des oocystes de cryptosporidies par rapport aux solutions conventionnelles (Inoue et al., 2003). Une seule étude a évalué les méthodes d'éluion USEPA et AFNOR sur les oocystes de toxoplasme (Villena, 2004). Il n'a pas été observé de différences entre les deux procédures pour un même type de prélèvements (eau distillée, eau de consommation et eau de surface). Il est à noter qu'aucun oocyste n'a été détecté dans des prélèvements turbides, sans que cet échec soit dû spécifiquement à l'éluion.

5.2.1.2. Flocculation

La flocculation est employée dans les stations de potabilisation des eaux pour clarifier les eaux turbides. Appliquée au toxoplasme, cette technique simple et peu coûteuse entraîne à pH acide (5,4 à 6,0) la flocculation des particules solides et des oocystes par des agents tels que le sulfate de fer ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) ou le sulfate d'aluminium ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$). Le surnageant éliminé, le floc est dissout (pH 4,0) et les oocystes sont concentrés par centrifugation (Kourenti et al., 2003). Il n'existe pas de différence significative entre les deux types de flocculation dans la récupération d'oocystes de toxoplasme sporulés ou non à partir d'1 L d'eau distillée. Les pourcentages moyens de récupération sont compris entre $90,4\% \pm 19,1\%$ et $100,3\% \pm 26,9\%$. Ces valeurs peuvent diminuer jusqu'à $35,9\% \pm 12,3\%$ selon l'inoculum et l'âge des oocystes, quelque soit l'agent utilisé. Cette technique est difficilement applicable

au traitement de volumes importants. Si ses effets sur la viabilité des oocystes de toxoplasme ne sont pas connus, la floculation peut diminuer celle des oocystes de cryptosporidies (Shepherd et Wyn-Jones, 1996). La floculation semble moins efficace que la filtration pour éliminer les inhibiteurs de PCR (Monis et Saint, 2001), comme les ions Fe³⁺ (Kourenti et Karanis, 2004).

5.2.1.3. Centrifugation

Cette technique a permis à Dubey, Weigel et al. (1995) d'analyser des prélèvements de faible volume effectués dans plusieurs fermes porcines américaines. Expérimentalement, la centrifugation a été évaluée sur un volume maximal d'1 L d'eau non turbideensemencé avec 10⁵ ou 10⁴ oocystes conservés pendant 2 à 21 mois, à des vitesses comprises entre 1040 et 2889 g (Kourenti et al., 2003). Globalement, le pourcentage de récupération augmente avec la vitesse de centrifugation et avec l'âge des oocystes et diminue avec l'inoculum. Cette technique est moins sensible que la floculation et ne permet pas le traitement de plusieurs dizaines de litres (Kourenti et al., 2003).

5.2.2. Purification

5.2.2.1. Flottation

Avec une densité minimale de 1,15, les solutions de saccharose et de Percoll-saccharose sont utilisées pour purifier les oocystes de toxoplasme qui ont une densité de 1,104-1,140 (Dubey, Miller et al., 1970b ; Dubey, Weigel et al., 1995 ; Isaac-Renton et al., 1998 ; Villena et al., 2004). Leur inconvénient majeur est leur faible spécificité puisque certains débris (végétaux notamment) sont co-extraits avec les oocystes particulièrement à des fortes densités (1,28-1,30) (LeChevallier et al., 1995 ; Villena, 2004). D'autre part, des oocystes pourraient échapper à la purification en raison d'une augmentation de leur densité par interactions avec les débris (Bukhari et Smith, 1995). A défaut de méthodes plus spécifiques, la flottation est simple et peu coûteuse mais elle doit être couplée à un bio-essai et/ou à une détection par biologie moléculaire car elle ne permet pas la distinction microscopique entre *Toxoplasma gondii* et les coccidies proches du genre Hammondia et Neospora.

5.2.2.2. Séparation immunomagnétique (IMS)

Le principe de la séparation immunomagnétique (IMS) repose sur la capture d'une cellule-cible par des billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques, suivie de sa séparation des débris environnants à l'aide d'un dispositif magnétique (Safarik et Safarikova, 1999). L'IMS permet la purification de nombreux types cellulaires et la détection de microorganismes pathogènes dans la nourriture et l'eau. Les kystes de *G. intestinalis*, les oocystes de *C. parvum*, et dans une moindre mesure ceux de *C. cayetanensis* bénéficient de protocoles d'IMS (Robertson et al., 2000 ; USEPA, 2001). Un point important est l'absence d'IMS pour les oocystes de toxoplasme due à l'absence d'anticorps monoclonaux dirigés contre la paroi des oocystes. De nombreux travaux ont démontré la supériorité de l'IMS sur les techniques de flottation à partir d'échantillons peu turbides

(revus par Quintero-Betancourt et al., 2002 et Zarlenga et Trout, 2004). Les pourcentages de récupération des oocystes de cryptosporidies et des kystes de *Giardia* peuvent être très élevés (jusqu'à 100%) et semblent indépendants de l'âge des organismes (Bukhari et al., 1998 ; Rochelle et al., 1999 ; McCuin et al., 2001). Cependant, plusieurs facteurs diminuent la sensibilité de l'IMS : la teneur des échantillons en fer dissout (Yakub et Stadterman-Knauer, 2000), le pH (Kuhn et al., 2002) et la quantité de débris que l'on peut relier à la turbidité (Di Giovanni et al., 1999). Ces derniers auteurs ont évalué le rendement de l'IMS après filtration. Ils ont obtenu des pourcentages de récupération de 9 à 26% dans des eaux de surface. Les interactions oocystes-débris diminuent les possibilités de reconnaissance des oocystes par les billes magnétiques recouvertes d'anticorps monoclonaux.

5.2.2.3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux nécessite également des anticorps monoclonaux. Elle permet de compter avec précision de faibles quantités d'oocystes de cryptosporidies dans l'eau (Quintero-Betancourt et al., 2002). Sa sensibilité dépend du bruit de fond parfois important dû à la fixation non spécifique d'un anticorps aux débris ou à l'autofluorescence de ces derniers. Appliquée au toxoplasme, cette difficulté pourrait être surmontée en triant les oocystes en fonction de leur taille et de leur autofluorescence caractéristique, comme cela a été montré pour *Cyclospora cayetanensis* (Varma et al., 2003).

5.2.3. Détection

5.2.3.1. Microscopie

La microscopie optique est suffisante pour l'examen de prélèvements très contaminés comme des fèces de chats. L'autofluorescence facilite la détection des oocystes au milieu des débris mais ne permet pas de distinguer *Toxoplasma gondii* d'*Hammondia hammondi*. Dans des prélèvements hydriques aléatoires, la confusion peut s'étendre à *Hammondia heydorni* et aux espèces du genre *Neospora*. De plus, certains oocystes ne fluorescent pas et peuvent conduire à une fausse négativité (Dumètre et Dardé, 2003). L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèce est envisageable dans un test d'immunofluorescence, non utilisé jusqu'à présent pour les oocystes de toxoplasme.

5.2.3.2. Analyse moléculaire

Le toxoplasme est souvent mis en évidence dans les liquides biologiques et les tissus par amplification du gène B1 par PCR. La détection d'oocystes par PCR est plus aléatoire en raison (i) de la résistance de la paroi aux méthodes habituelles d'extraction d'ADN et (ii) de la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons à analyser. (i) les méthodes d'extraction d'ADN des oocystes de coccidies reposent surtout sur une fragilisation physique ou chimique de la paroi. Les traitements physiques sont généralement la sonication, l'alternance congélation/décongélation et l'agitation des oocystes avec des billes de verre (Wiedenmann et al., 1998). Les traitements chimiques consistent à incuber les oocystes dans des solutions enzymatiques (protéinase K ou milieux conventionnels pour le dékystement des sporozoïtes) ou avec des composés

qui perturbent l'intégrité des parois (hypochlorite de sodium, cetyl trimethyl ammonium bromide ou CTAB) (Zhao et al., 2001). Cependant, il n'existe pas de méthode standard et plusieurs traitements sont généralement combinés. Cette première étape, obligatoire, est suivie par un temps d'extraction et de purification de l'ADN, par des méthodes classiques (Wiedenmann et al., 1998). (ii) des substances solubles telles que les acides humiques, les polysaccharides et les phénols, ainsi que certains ions sont les principaux inhibiteurs de PCR rencontrés dans les matrices environnementales (Sluter et al., 1997 ; Wilson, 1997 ; Frostegard et al., 1999). Une première partie peut être éliminée par IMS ou par cytométrie en flux (Johnson et al., 1995), une seconde par l'ajout d'agents chélateurs pendant l'extraction d'ADN (Sturbaum et al., 1998 ; Hallier-Soulier et Guillot, 2000 ; Orlandi et al., 2000), une troisième par l'incorporation, dans le milieu réactionnel de PCR, de sérum albumine bovine (BSA) qui empêche l'inactivation de la Taq polymérase par les phénols (Kreader, 1996 ; Rochelle et al., 1997 ; Ward et Wang, 2001 ; Villena et al., 2004). Les travaux de Schwab et McDevitt (2003), Kourenti et Karanis (2004), Villena, 2004 et Villena et al. (2004) ont confirmé une diminution de la sensibilité de la PCR en conditions turbides. Seuls Villena et al. (2004) ont évalué la PCR après toutes les étapes de traitement d'un prélèvement contaminé (de sa filtration à la détection moléculaire). Le seuil de détection de 1 oocyste / L est atteint dans 50-60% des cas en conditions non turbides. En conditions turbides, 1000 oocystes / L sont mis en évidence dans 50% des cas et 100 / L dans 20% des cas.

5.2.3.3. Viabilité et virulence

L'inoculation à la souris reste le seul bio-essai envisageable pour l'étude de la viabilité et de la virulence des oocystes circulant dans l'environnement. Cependant, elle ne donne qu'une idée de l'infectiosité globale de la suspension parasitaire car un seul oocyste vivant peut suffire à infecter une souris. L'infectiosité est pratiquement identique par voie orale et par voie sous cutanée. Elle est supérieure d'un facteur 10 par voie intrapéritonéale pour une dose capable d'infecter environ 50% des souris (DL50) comprise entre 1 et 10 oocystes (soit entre 8 et 80 sporozoïtes) (Dubey et Frenkel, 1973). La virulence dépend surtout de l'inoculum et du génotype des oocystes. Pour des échantillons d'eau surchargés, la sensibilité de l'inoculation à la souris semble varier avec la turbidité des échantillons. Le seuil de 1 oocyste / L est atteint dans 20 à 30% des cas en conditions non turbides alors qu'il est de 1000 / L dans 30% des cas, en conditions turbides (Villena et al., 2004).

D'autres méthodes de mesure de la viabilité sont envisageables : colorations vitales, détection d'ARNm, électrorotation (Dalton et al., 2001). Un aspect microscopique très dégénéré des oocystes (contenu granuleux, absence de distinction des sporozoïtes au sein de l'oocyste) peut être un signe de non-viabilité mais non un élément de certitude. A ce jour, il n'existe pas de colorations vitales applicables au toxoplasme telles qu'elles sont proposées pour les cryptosporidies (Freire-Santos et al., 2000a). Leur application au toxoplasme ne semble pas évidente en raison des différences marquées dans la structure et la composition des parois de leur oocyste (Dumètre et Dardé, 2003). La détection d'ARNm par RT-PCR a été utilisée pour détecter d'autres protozoaires dans l'eau

(Kaucner et Stinear, 1998) mais la sensibilité dépend des protocoles d'extraction d'ARN et de la présence d'inhibiteurs de PCR (Carey et al., 2004).

5.3. Détection dans les matrices solides

Les méthodes de concentration hydrique ne sont pas applicables pour traiter des végétaux ou des échantillons de sol. Les techniques décrites reposent sur une homogénéisation mécanique de l'échantillon et une purification par flottation sur saccharose (Fleck et al., 1972 ; Ruiz et al., 1973 ; Frenkel et al., 1975 ; 1995 ; Coutinho et al., 1982 ; Dubey et al., 1995 ; Kniel et al., 2002 ; Matsuo et al., 2004). Les oocystes sont mis en évidence par inoculation à la souris. Des techniques similaires sont utilisées sur les mollusques (Lindsay et al., 2001 ; Lindsay, Collins et al., 2004b ; Arkush et al., 2003). Trois paramètres, liés entre eux, sont critiques pour la recherche des oocystes dans les matrices solides : la taille de l'échantillon, l'efficacité de la purification et la présence d'inhibiteurs de PCR. La taille de l'échantillon doit être la plus importante possible compte tenu de la faible quantité d'oocystes par gramme de matière, même si ponctuellement des sols ou des végétaux peuvent se retrouver très contaminés par des excréments de chats. La taille des échantillons analysés varie de 1 à 500 grammes pour de la terre (Ruiz et al., 1973 ; Frenkel et al., 1975 ; Coutinho et al., 1982 ; Matsuo et al., 2004) et de 3 à 6 grammes pour des baies (Kniel et al., 2002). L'efficacité de la purification a été évaluée par Matsuo et al. (2004) sur 30 grammes de terreensemencés avec 500 oocystes. L'ajout de gélatine, avant et pendant la flottation fait varier significativement le pourcentage de récupération de 7 à 21%. Il a été montré que l'incorporation d'agents dispersants et de solutions détergentes optimisait la récupération des oocystes de cryptosporidies (Kuczynska et Shelton, 1999 ; Davies et al., 2003 ; Inoue et al., 2003). D'autre part, l'étape de flottation pourrait être améliorée en utilisant d'autres solutions denses que celle de saccharose : Percoll, chlorure de césium, bromure de potassium (Kuczynska et Shelton, 1999 ; Chesnot et Schwartzbrod, 2004). Les inhibiteurs de PCR présents dans le sol (acides humiques surtout) peuvent être levés notamment par l'ajout de BSA. Une sensibilité de 1 oocyste de toxoplasme / gramme de terre a été obtenue par Matsuo et al. (2004). Les effets inhibiteurs des composés phénoliques présents dans les végétaux peuvent être levés par du lait écrémé (De Boer et al., 1995). L'analyse de végétaux frais est préférable car ils contiennent moins d'inhibiteurs que les végétaux abîmés (Anonyme, 1997).

5.4. Synthèse des méthodes proposées

Sur la base des méthodes qui existent pour détecter les oocystes de *Toxoplasma gondii* et d'autres protozoaires (*Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*), nous proposons un schéma de synthèse des méthodes qui pourraient être utilisées couramment pour la détection des oocystes de toxoplasme (figure 6). Certaines d'entre elles ont été développées, évaluées, et appliquées au cours du travail de thèse de Dumetre Aurélien(2003).

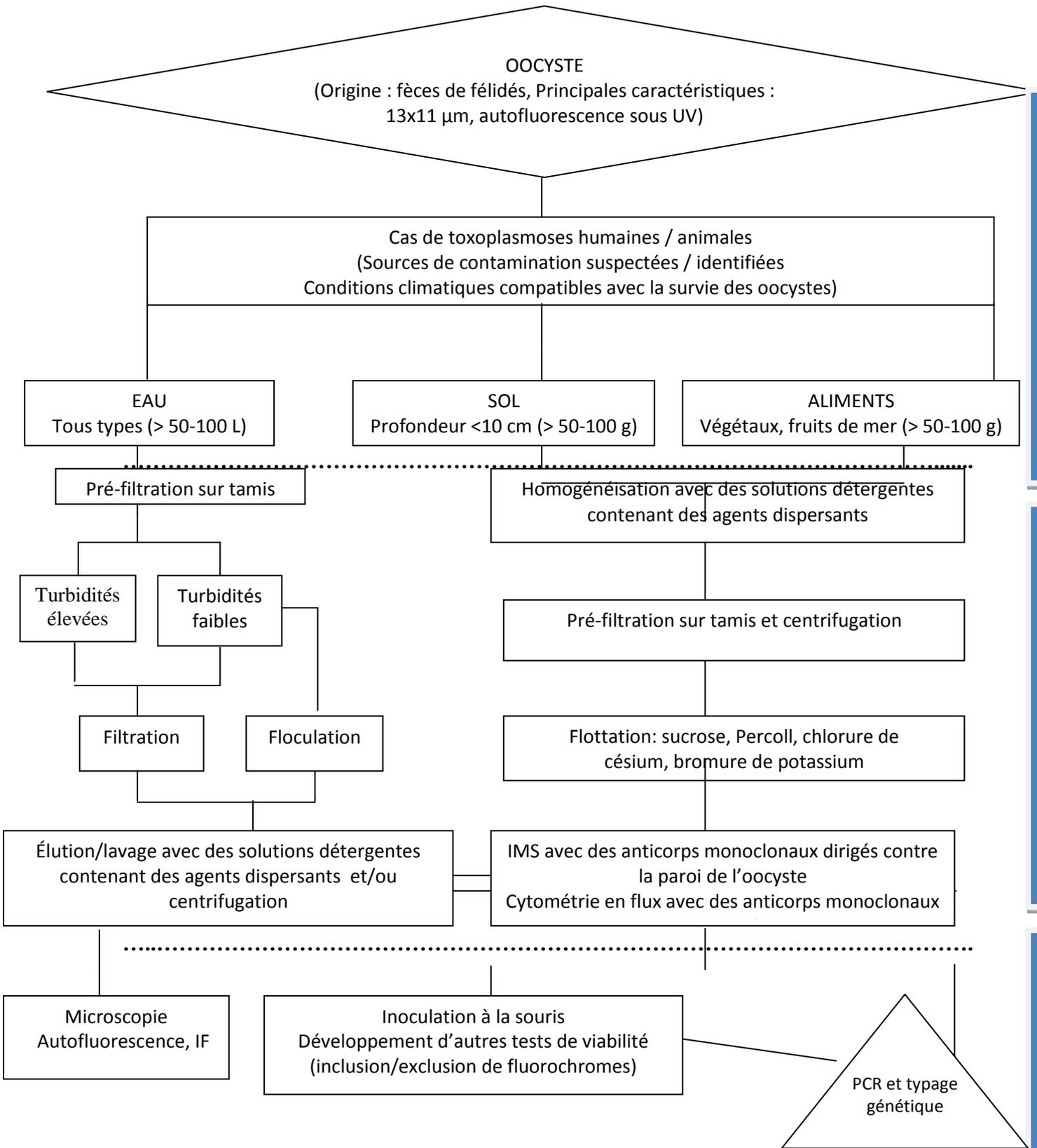


Figure 6 : Méthodes de détection des oocystes de toxoplasme dans les matrices environnementales. (Dumetre Aurélien ,2003).

6. Conclusion - Objectifs

Les points importants à retenir concernant le rôle épidémiologique des oocystes

dans la toxoplasmose sont:

- seuls les félins assurent une dissémination primaire des oocystes. Des facteurs biotiques (invertébrés) et abiotiques (eau, sol) permettent une dissémination secondaire. Les hôtes non strictement carnivores sont particulièrement soumis à une contamination par les oocystes.
 - les parois de l'oocyste et du sporocyste maintiennent l'infectiosité des sporozoïtes pendant plusieurs mois dans l'environnement. Les bases biochimiques de cette résistance ne sont pas élucidées car la composition et les propriétés de ces parois sont peu étudiées.
 - la résistance des oocystes à certains procédés de traitement de l'eau de boisson (chloration) peut être à l'origine d'une contamination d'un nombre significatif d'individus. Les cas groupés de toxoplasmoses humaines par ingestion d'oocystes sont très souvent symptomatiques, indépendamment du statut immunitaire des individus. Leur association avec des génotypes particuliers n'est pas évidente.
 - d'une façon générale, les sources de contamination restent mal identifiées, en raison d'un manque de méthodes appropriées pour détecter directement les oocystes dans les matrices environnementales. Des espèces animales peuvent être utilisées comme bio indicatrices de la présence des oocystes dans l'eau ou le sol. Certaines sont consommées par l'homme.
 - au final, il y a un manque de données concernant la prévalence de la toxoplasmose animale et/ou humaine au Sénégal.
- C'est à cet effet que nous allons essayer de la déterminer dans un premier temps chez les animaux domestiques notamment le chat et le chien et chez la femme puis de caractériser génétiquement les souches retrouvées et de les comparer avec les données de la littérature (souches de référence).

-Enfin nous allons essayer d'évaluer l'efficacité du traitement humain chez les femmes séropositives faisant une infection récente active ou chronique.

L'objectif de ce travail est de déterminer la séroprévalence de la toxoplasmose chez certains animaux domestiques (Chien et chat) et chez la femme, et si possible de les comparer génétiquement aux isolats de référence provenant essentiellement de cas humains. Pour cela, deux approches sont proposées (figure 7).

Détection du Toxoplasme chez les animaux

➤ Détection des oocystes dans les fèces d'animaux domestiques :

- Mise en solution dans l'eau
- Pré-filtration sur tamis
- Filtration
- Elution /lavage avec des solutions détergentes contenant des agents dispersants ou centrifugation
- Microscopie (Autofluorescence)

➤ Production et purification d'oocyste au laboratoire

➤ Dosage sérologique chez les animaux (chat et chien)

➤ Dosage sérologique chez la femme

➤ Prévalences déterminées

➤ Evaluation de l'efficacité du traitement chez la femme séropositive

Comparer génétiquement les Toxoplasmes isolés chez les animaux domestiques (Chien et chat) et chez la femme à ceux associés aux toxoplasmoses humaines

Figure 7 : Objectifs de l'étude et méthodologie appliquée.

2ème partie

PARTIE 2: TRAVAIL PERSONNEL

I-ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE

A-Détermination de la séroprévalence chez la femme et chez les animaux (chien et chat)

L'objectif du travail que nous présentons ici s'inscrit dans la préoccupation d'apprécier le degré d'infestation de certains animaux domestiques (les félins) et de la femme en déterminant la prévalence la toxoplasmose chez le chat et le chien mais aussi chez la femme surtout celle enceinte au Sénégal. Elle fait l'objet d'un article publié le 1 juillet 2013 par Open Science Repository Medicine, doi: [10.7392/openaccess.70081980](https://doi.org/10.7392/openaccess.70081980), July 1, 2013

I-1-Population d'étude

Notre population d'étude est composée de 50 chats et de 20 chiens et de 179 femmes venues faire une sérologie toxoplasmique au CABM du centre hospitalier Abass NDAO pour respectivement 50,20 et 179 sérologies réalisées.

I- 2-Matériel et méthode de dosage

I-2-1-Matériel

a) Matériel technique

- Pipettes de précision (pipettes Pasteur) avec embout à usage unique
- Réfrigérateur, Ciseaux, Chronomètre de laboratoire ou montre
- Centrifugeuse, Garrot, Marqueurs ordinaires (écritoires)
- Tubes secs, Etuve, Bain-marie à 37°C, Coton hydrophile
- Papier adsorbant, Gants stériles, Aiguilles, support -aiguilles
- Tampon alcool à 70°, Portoires
- Trousse Immunocombs ®Toxo Ig G
- Trousse Immunocombs ®Toxo IgM

b) Matériel biologique

- Prélèvements sanguins effectués sur les patientes venues faire une sérologie toxoplasmique au CABM du Centre Hospitalier Abass NDAO.
- Prélèvements sanguins effectués sur des chats et chiens capturés pour la circonstance

I-2-2-Méthode de dosage

I-2-2-1-Chez la femme

On a utilisé le test immunoenzymatique en phase solide d'Orgenics SA (Immunocombs) basé sur un principe d'ELISA sur support insoluble représenté par les peignes et un bac de développement avec une pré-dilution des sérums pour le dosage des anticorps de type IgM conformément aux directives du fabricant. Le seuil de positivité est de 10 UI/ml pour les IgG et un CombScals (carte de correspondance des couleurs avec les concentrations) permet de déterminer le titre. Le dosage des IgM obéit au même principe mais ici le test est qualitatif. (Annexe 1).

I-2-2-2-Chez les Animaux (le chien et le chat)

On a utilisé le test d'agglutination direct sur plaque qui consiste à mélanger une goutte de sérum avec une goutte de Pastorex Toxo-latex BIO-RAD dont la positivité est matérialisée par une agglutination visible à l'œil nu au bout de 2 minutes d'agitation rotative. Le seuil de positivité à 6 UI/ml.

I-3-Résultats et Discussion

I-3-1-Résultats

a) Chez la Femme

Les résultats sont consignés dans le tableau ci après :

2012→Femme			
	Sérums testés	Positif	Prévalence ±Intervalle de Confiance (%)
Janvier	28	14	50 ±18,52
Février	8	3	37,5 ±33,55
Mars	20	5	25 ±18,98
Avril	26	12	46,15 ±19,16
Mai	2	0	0 ± 0
Juin	33	25	75,76 ±14,62
Juillet	42	20	47,62 ±15,10
Août	8	2	25 ±30,01
Septembre	4	1	25 ±42,43
Octobre	5	0	0 ± 0
Novembre	3	0	0 ± 0
Total	179	82	45,81 ±7,30
Prévalence moyenne			30,18 ±17,49

Tableau 5 : Variation mensuelle de la toxoplasmose au CHAN du 01 janvier au 30 Novembre 2012.

D'après le tableau 5 on note une variabilité des cas positifs selon les mois avec des pics en Juin et juillet (25 et 20 respectivement). Elle montre une prévalence de $45,81 \pm 7,30$ % avec celle moyenne à $30,18 \pm 17,49$ %.

b) Chez le chien et le chat

2012→ CHAT			
Mois	Sérum testé	Positif	Prévalence ± IC (%)
Janvier	10	10	100 ± 0
Février	8	3	37,5 ±33,55
Mars	5	2	40 ±42,94
Avril	12	9	75 ±24,50
Mai	0	0	0
Juin	2	1	50 ±69,30
Juillet	3	2	66,67 ±53,34
Août	5	3	60 ±42,94
Septembre	5	5	100 ±0
Total	50	35	70±12,70
Prévalence moyenne			58,8 ± 29,62

2012→ Chien			
Mois	Sérum testé	Positif	Prévalence ± IC (%)
Janvier	3	1	33 ,33 ± 53,34
Février	2	0	0
Mars	3	1	33,33 ±53,34
Avril	3	0	0
Mai	2	1	50 ±69,30
Juin	2	1	50 ±69,30
Juillet	3	1	33,33 ±53,34
Août	1	0	0
Septembre	1	0	0
Total	20	5	25 ±18,98
Prévalence moyenne			22,21 ± 33,18

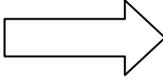
Tableau 6 : Prévalences moyenne et globale chez le chat et le chien

D'après le tableau 6 on note une variabilité des cas positifs selon les mois avec des pics en Janvier et en Avril pour le chat (10 et 9 respectivement). Cependant les prévalences moyennes sont élevées (58,8 ±29,62 % et 22,21± 33,18 % respectivement) ainsi que la prévalence globale (70 ±12,70 % et 25 ± 18,98 % respectivement).

I-3-2-Discussion



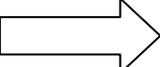
Chez le Chat errant, une prévalence globale égale à $70 \pm 12,7 \%$ a été trouvée lors de notre étude. Ce taux est supérieur à ceux trouvés au Sénégal en 2012 par **Adjé Koffi à Kaolack** ($58 \pm 9,7 \%$ et $59,8\% \pm 9,6$: apparente et réelle) qui correspond à celle moyenne ; **Allanonto à Saint Louis** (68%), **Andrée Prisca Ndjoug NDOUR** à Dakar ($55,37 \pm 9\%$) et enfin **Coulibaly à Dakar** ($55,3 \pm 9 \%$ et $57 \pm 8,8\%$: apparente et réelle) mais aussi à celui trouvé par Cabannes, en France en 1997 (mode de vie "urbain") (43 %) sur 519 chats de Gironde en utilisant l'immunofluorescence indirecte avec comme seuil de positivité 1/50 dont 12 % des chats avaient un titre élevé ($>1/1500$). Cette différence pourrait s'expliquer par la technique utilisée et la taille de l'échantillon. Aurélien Mercier avait trouvé en 2010 une prévalence de 84,0 % (26 positifs/31 testés) à Dienga (Gabon) avec un intervalle de confiance de 66,3 à 94,5% qui inclut notre prévalence. Ceci pourrait s'expliquer par la fréquence élevée en chat dans nos deux pays. De plus Tender en 2000 avait trouvé une prévalence de 55 % en Allemagne- Hannovre chez des Chats errants en 1994. Ladiges, en 1982 avait trouvé une prévalence de 41 % aux USA- Washington State auprès de Chats errants. Dubey en 1973 puis Dubey, Saville et al. en 2002 avaient rapportés une prévalence $>55\%$ parmi les chats évitant tout contact avec l'homme ou vivant dans des zones de transmission toxoplasmique importante. En France, la séroprévalence rapportée par Pestre-Alexandre et al., en 1984 et Cabannes et al., en 1997 est d'environ 40 à 60%. Ces taux sont largement en deçà de la prévalence trouvée par notre étude. Plus récemment, avec l'ADHS, des prévalences variables ont été observées dans différentes populations naturelles : 21 % chez 282 chats d'un milieu urbain, 54 % et 58 % chez 209 et 171 chats de deux populations rurales distinctes (Thulliez, Fromont, communication personnelle). Notre taux est plus élevé pouvant se justifier par la taille de notre échantillon (50 chats). Dubey, Navarro et al. , en 2004 avaient rapportés une séroprévalence $<40\%$ chez des chats vivants en intérieur et nourris avec une alimentation industrielle. De plus Lappin en 1989, avait trouvée une prévalence d'IgG de 41 % en Géorgie (USA) et 60,6 % en associant les recherches d'IgM et d'IgG sur un effectif de 189 chats. Quoique notre étude n'a détecté que les anticorps de type IgG, notre taux dépasse de loin ceux trouvés par ce dernier dont la taille de l'échantillon pourrait justifier cela. Aussi, nos valeurs sont largement au dessus de celles trouvées par Tenter en 2000 qui avait rapporté une prévalence de 11 % au Japon, 6-33% en Asie dans les 50 études publiées au cours des dix années précédentes chez les chats sauvages. Cependant il rapporte une prévalence de 73 % au Brésil similaire à la notre et de 71 % au Mexique chez des chats domestiques. De même que Silva et al. en 2001 puis Kikuchi et al. en 2004 qui avaient rapporté une prévalence de 50-75% en régions intertropicales. Compte tenu du rôle fondamental joué par le chat dans la transmission de la toxoplasmose, ceci nécessite une plus grande considération de la part des autorités publiques.



Chez le chien une prévalence globale de $25 \pm 18,98 \%$ a été trouvée lors de notre étude avec celle moyenne à $22,21 \pm 33,18 \%$. On retrouve peu de données indiquant une prévalence très faible chez le chien. Cependant Adjé Koffi à Kaolack en 2012 avait trouvé une prévalence apparente de $58 \pm 9,7 \%$ et réelle de $59,8\% \pm 9,6\%$ supérieur à la notre. Aussi Coulibaly à Dakar en 2012 avait décrit une prévalence apparente de $43,9 \pm 8\%$ et réelle de $45 \pm 8,2\%$.

Allanonto à Saint Louis avait trouvé en 2012 : 48% Ces différences pourraient s'expliquer par la ressemblance entre les oocystes de *Neospora caninum* et de *Toxoplasma gondii* et de la taille de mon échantillon. Les conditions climatiques notamment la chaleur et l'humidité, la taille de notre échantillon et la proximité entre chiens et chats pourrait ici expliquer ce taux élevé trouvé lors de cette étude. Cependant Aurélien Mercier avait trouvé en 2010 une prévalence

de 55,9 % à Libreville au Gabon (33 positifs/59 testés) et 61,4 % à Dienga (43 positifs/ 70 testés) supérieur à celle de notre étude.



Chez la femme, on a trouvé une séroprévalence globale de **45,81 ± 7,30 %** analogues à celle trouvée par Coulibaly en 2012 à Dakar (50% chez les femmes) par Andrée Prisca Ndjoug NDOUR en 2012 à Dakar (43,8%) et ceux qui ont été observés en France en 2003 par Berger qui avait trouvé une séroprévalence de 44%. Ces taux sont aussi analogues à ceux qui ont été observés au Sénégal par d'autres études notamment celle de Ndiaye qui avait trouvé une séroprévalence de 44,4 % en 2010 lors d'une étude prospective de janvier 2010 à octobre 2012 sur une période de 10 mois à propos de 209 personnes en utilisant la méthode EIA. Aussi , Faye ,en 1998, sur 353 femmes en âge de procréer dont les 205 étaient en état de grossesse et 148 non enceintes en vue d'un sondage épidémiologique, avait révélé une séroprévalence de 40,2 % avec un intervalle de confiance compris entre **30,6 % et 49,8 %** ; la méthode utilisée étant l'Elisa et le seuil de positivité à 10UI/ml. Ces résultats sont en phase avec ceux découlant des données en Europe du Sud et dans les régions humides de l'Afrique d'après Polderman en 1999 et en Italie - Parme avec Valcavi (48,5%) sur 19 432 adultes en 1995 utilisant l'ELISA. Aussi en 2003 en Malaisie Nissapatorn avait trouvé 45% chez 200 femmes enceintes en utilisant l'ELISA. Ces résultats s'écartent de plus de 15,81 % des données sur la prévalence dans les pays scandinaves et dans le Royaume-Uni (<30 %) mais aussi en Asie ou en Amérique d'après Jones et McQuillan G. (13,16) pouvant être expliquer par les différences des modes de vie. De même DIALLO en 1993 avait trouvé une séroprévalence de 30 % lors d'une étude rétrospective sur 20 ans à propos de 720 personnes en utilisant la méthode de Sabin et Feldman. Cette différence pourrait s'expliquer la technique utilisée par cet auteur et non sur la taille de la population d'étude. Cependant elle est similaire à celle moyenne 30,18±17,49 %. De même des études effectuées en 1995 par Gentilini et celles par la suite plus récentes avaient montré une séroprévalence de 18% en Afrique Noire particulièrement au Sénégal. De par cette étude on note un accroissement de 27,81 % en l'espace de 18 ans qui pourrait s'expliquer par une systématisation de cette sérologie chez la majorité des femmes enceintes mais aussi par la promiscuité galopante, la méconnaissance de la maladie et du rôle joué par le chat dans sa transmission compte tenu de son fort taux de contamination. Plus récemment, au Sénégal, plusieurs travaux ont été faits en 2012 ainsi Adjé Koffi a trouvé une séroprévalence de 24,2% chez 170 femmes enceintes en consultation prénatale à Kaolack inférieure à notre étude. Allanonto a observé en 2012 une prévalence de 32,9% chez 86 femmes à Saint-Louis proche de la prévalence moyenne mais

inférieure à la prévalence globale trouvée par cette étude. Cette différence pourrait s'expliquer par la technique utilisée et la taille de l'échantillon.

Ces résultats sont en deçà des données en Europe de l'Ouest d'après Polderman en 1999 qui avait trouvé une séroprévalence de 50 à 70 %, écart pouvant être expliqué par la cohabitation dans ce pays avec l'hôte intermédiaire fondamental de cette parasitose. De même qu'avec les études de Mowan en 1999 à l'institut Pasteur de Bangui en République Centrafricaine qui avait trouvé une séroprévalence de 50,1 % sur une population d'étude de 1953 sujets dont 1658 femmes et 295 hommes en utilisant le test IHA et l'Elisa avec comme seuil de positivité à 6 UI/ml. Aussi Deniau avait trouvé une séroprévalence de 65,7 % à Yaoundé en 1985 sur une population d'étude de 286 femmes en utilisant l'IFA et l'IHA. De même que Nabias qui, au Gabon en 1998, avait trouvé une séroprévalence de 71,2 % chez la femme enceinte sur une population d'étude de 767 femmes enceintes en utilisant le test au latex pastorex Toxo de l'institut Pasteur et l'immunocapture Vidas Toxo IgM de Biomérieux avec comme seuil de positivité à 4 UI/ml. Aussi Bobic avait trouvé en 98 en Yougoslavie une prévalence de 77,4 % chez 1 157 femmes âgées de 15-45 en utilisant le DT comme méthode et 58,4% par Bouratbine en Tunisie en 2001 sur 1 421 personnes en utilisant l'IFA et l'ELISA.

Ces forts taux placeraient le Sénégal parmi ceux ayant un plus faible taux de prévalence en Afrique mais il est aussi avéré que la variation de prévalence pourrait se justifier sur les seuils de positivité trop faibles par rapport à notre étude. Cependant cette étude placerait notre pays au devant de la scène avec une séroprévalence qui ne cesse de monter en crescendo ; plus de 9,81 % en 8 ans déjà par rapport à l'étude de 2004. Ceci pourrait s'expliquer par une ingestion d'oocystes à partir du réservoir tellurique du fait de la cohabitation avec les chats errants dont 70 % sont infectés et la non connaissance par nos populations de la maladie, du rôle joué par ces derniers dans sa transmission et de l'insuffisance de l'accompagnement de l'état dans le cadre de sa politique sanitaire pour éradiquer cette parasitose. Aussi ces forts taux de séroprévalence trouvés chez le chat et le chien justifieraient le niveau d'exposition des femmes dont la séroprévalence croît d'année en année.

En conclusion pour cette partie, nous dirons qu'au regard des prévalences élevées chez les animaux domestiques compagnons de l'homme c'est-à-dire le chien (globale $25\pm 18,98\%$ et $22,21\pm 33,18\%$ en moyenne) et le chat (globale $70\pm 12,70\%$ et $58,8\pm 29,62\%$ en moyenne) nous ne nous étonnons pas que la prévalence soit élevée chez la femme (globale : $45,81\pm 7,30\%$ et $30,18\pm 17,49\%$ en moyenne) avec $44,24\pm 7,58\%$ (73 Positifs/ 165 testées) chez celles enceintes. Cependant elle est alarmante et étant donné qu'aucun vaccin n'est disponible pour le moment, il serait important et urgent que les autorités de la Santé puissent sensibiliser, informer et éduquer la population de par le respect des mesures hygiéno-diététiques pour éviter l'ingurgitation des oocystes et la mise en place d'un programme national de lutte contre la toxoplasmose en vue de réduire cette flambée de la prévalence et parer ainsi aux complications surtout chez la femme enceinte et les sujets immunodéprimés.

B- Etude de l'efficacité de la Spiramycine sur le traitement de la toxoplasmose

L'objectif du travail que nous présentons ici s'inscrit dans la préoccupation tout à fait récente d'évaluer l'efficacité de la Spiramycine sur le traitement de la toxoplasmose chez la femme séropositive à Dakar.

Pour s'y faire, elles vont toutes bénéficier du même traitement à savoir de la Spiramycine (Rovamycine 3 millions UI) 1 cp matin et soir avec control sérologique tous les mois pour apprécier leur profil sérologique. et control échographique tous les 2 mois. Elle fait l'objet d'un article publié le 19 juin 2013 par Open Science Repository Medicine doi: [10.7392/openaccess.70081973](https://doi.org/10.7392/openaccess.70081973), 19 Juin 2013

I-1-Population d'étude

Notre population d'étude est composée de 82 femmes de sérologie toxoplasmique positive au CABM du centre hospitalier Abass NDAO. Elles ont toutes reçu un traitement et satisfaisant aux contrôles sérologiques gratuitement.

I- 2-Matériel et méthode de dosage : Identique au (A)

I-3-Résultats et Discussion

I-3-1-Résultats et interprétation

a)Données sérologiques

a1) A la première sérologie (S1) :

MOTIFS DE CONSULTATION (S1)	sérologies positives		IgM+/IgG-		IgM-/IgG+		Ig M+/Ig G+		IgM +/-/Ig G+		Ig M+/-/Ig G-	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
Bilan de grossesse	73	89,02	5	6,1	38	46,34	25	30,49	4	4,87	1	1,22
Avortement à répétition	9	10,98	5	6,1	0	0	4	4,87	0	0	0	0
Divers (bilan)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	82	100	10	12,2	38	46,34	29	35,36	4	4,87	1	1,22

Tableau 7 : Résultats positifs de la première sérologie en fonction du type d'anticorps

D'après le tableau 7, 82 patientes étaient contaminées dont les 38 (46,34%) faisaient soit une infection récente évolutive soit une infection ancienne chronique ; les 29 (35,36%) une infection récente active ; les 10 (12,2%) une infection récente précoce ou une fixation non spécifique d'anticorps de type IgM ; les 4 (4,87 %) une infection ancienne évolutive ou

chronique et l'une (1,22%) une infection récente précoce ou une fixation non spécifique d'anticorps de type IgM.

a-1-1-Selon les anticorps de type IgM :

Motifs de consultation	Nombre d'examens sérologiques	Anticorps de type IgM (S1)					
		Positif		Traces		Négatif	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
Bilan de grossesse	165	30	16,76	5	2,79	130	72,63
Avortement à répétition	13	9	5,03	0	0	4	2,23
Autres (bilan)	1	0	0	0	0	1	0,56
Total	179	39	21,79	5	2,79	135	75,42

Tableau 8: répartition des examens sérologiques en fonction des motifs de consultation et des anticorps de type IgM.

D'après le tableau 8, sur 179 tests effectués, 44 étaient porteurs d'IgM (soit 24,58%) et 135 négatifs (soit 72,42%). Parmi les positifs, les 35 (soit 19,52 %) avaient consulté pour un bilan de grossesse et les 9 (soit 5,03 %) pour un avortement à répétition. Chez la femme enceinte, sur 165 tests effectués, 130 étaient négatifs (soit 72,63%) ; chez celles consultant pour un avortement à répétition, les 4 étaient négatifs (soit 2,23 %) et chez celles consultant pour divers (bilan) les 3 tests effectués étaient négatifs (soit 0,56 %).

a-1-2- Selon les anticorps de type IgG

D'après le tableau 9, sur 179 tests effectués, 71 étaient porteurs d'IgG (soit 39,65 %) et 108 négatifs (soit 60,34%), Parmi les positifs, 67 avaient consulté pour un bilan de grossesse (soit 37,42%) et les 4 pour avortement à répétition (soit 2,23). Chez la femme enceinte, sur 165 tests effectués, les 98 étaient négatifs (soit 54,75 %) ; chez celles consultant pour avortement à répétition, les 9 étaient négatifs (soit 5,03 %) ; et tous les divers (bilan) étaient négatifs (soit 0,56 %)

Motifs de consultation	Titre d'anticorps de type IgG (S1)							
	NEGATIF		POSITIF					
	T<10 UI/ml		10≤T<50UI/ml		50 ≤T<100UI/ml		T≥100 UI/ml	
	NBRE	%	NBRE	%	NBRE	%	NBRE	%
Bilan de grossesse	98	54,75	64	35,75	3	1,67	0	0
Avortement à répétition	9	5,03	4	2,23	0	0	0	0
Divers (bilan)	1	0,56	0	0	0	0	0	0
Total	108	60,34	68	37,98	3	1,67	0	0

Tableau 9 : répartition des examens sérologiques en fonction des motifs de consultation et des anticorps de type IgG.

a2) A la deuxième sérologie (S2) : (à un mois d'intervalle sous traitement)

MOTIFS DE CONSULTATION (S2)	sérologies positives		IgM+/IgG-		IgM-/IgG+		Ig M+/Ig G+		IgM +/-/Ig G+		Ig M+/-/Ig G-	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
Bilan de grossesse	69	93,24	0	0	69	93,24	0	0	0	0	0	0
Avortement à répétition	5	6,76	0	0	5	6,76	0	0	0	0	0	0
Total	74	100	0	0	74	100	0	0	0	0	0	0

Tableau 10 : Résultats positifs de la deuxième sérologie en fonction du type d'anticorps

D'après le tableau 10, toutes les 74 patientes avaient une sérologie positive à IgG (100%) faisant soit toxoplasmose évolutive soit une tendance vers la guérison.

D'après le tableau 11, sur 82 tests effectués, 74 étaient porteurs d'IgG (soit 90,24 %) et 8 négatifs (soit 9,76%), Parmi les positifs, 69 avaient consulté pour un bilan de grossesse (soit

84,14%) et les 5 pour avortement à répétition (soit 6,1 %). Chez la femme enceinte, sur 73 tests effectués après traitement, les 4 étaient négatifs (soit 4,88 %); et chez celles consultant

Motifs de consultation	Titre d'anticorps de type IgG (S2)							
	NEGATIF		POSITIF					
	T<10 UI/ml		10≤T<50UI/ml		50 ≤T<100UI/ml		T≥100 UI/ml	
	NBRE	%	NBRE	%	NBRE	%	NBRE	%
Bilan de grossesse	4	4,88	68	82,92	1	1,22	0	0
Avortement à répétition	4	4,88	5	6,1	0	0	0	0
Total	8	9,76	73	89,02	1	1,22	0	0

pour avortement à répétition aussi.

Tableau 11 : Répartition des sérologies positives en fonction du titre d'IgG au premier control

a3) A la troisième sérologie (S3) : (à un mois d'intervalle sous traitement)

MOTIFS DE CONSULTATION (S3)	sérologies positives		IgM+/IgG-		IgM-/IgG+		IgM+/IgG+		IgM +/-IgG+		IgM++/IgG-	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
Bilan de grossesse	69	93,24	0	0	69	93,24	0	0	0	0	0	0
Avortement à répétition	5	6,76	0	0	5	6,76	0	0	0	0	0	0
Total	74	100	0	0	74	100	0	0	0	0	0	0

Tableau 12 : Répartition des sérologies positives en fonction du titre d'IgG au second control

D'après le tableau 12, toutes les 74 patientes avaient une sérologie positive à IgG (100%) faisant soit toxoplasmose évolutive soit une tendance vers la guérison.

D'après le tableau 13, les 74 tests effectués, étaient positifs aux IgG (soit 100 %), Parmi les positifs, 69 avaient consulté pour un bilan de grossesse (soit 93,24%) et les 5 pour avortement à répétition (soit 6,76 %).

Motifs de consultation	Titre d'anticorps de type IgG (S3)					
	POSITIF					
	10 ≤ T < 50 UI/ml		50 ≤ T < 100 UI/ml		T ≥ 100 UI/ml	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
Bilan de grossesse	69	93,24	0	0	0	0
Avortement à répétition	5	6,76	0	0	0	0
Total	74	89,02	0	0	0	0

Tableau 13 : Répartition des sérologies positives en fonction du titre d'IgG au second control

I-3-2-Discussion

Lors de cette étude on a remarqué à la **première sérologie**, chez la femme enceinte que ,sur 165 tests effectués, 72 étaient positives et 1 douteuse soit une prévalence de $44,24 \pm 7,58$ % avec 25 positifs à IgM et IgG traduisant une infection récente active;5 positifs à IgM et négatifs à IgG pouvant s'agir d'une infection récente précoce ou d'une fixation non spécifique d'anticorps de type IgM;4 traces d'IgM et positifs à IgG pouvant traduire une infection récente évolutive ;1 trace IgM et négatif à IgG traduisant une fixation non spécifique ou un sérodiagnostic négatif ou une infection récente précoce.et 38 négatifs à IgM et positifs à IgG ayant un taux faible traduisant une mémoire immunitaire sauf 3 qui faisaient une infection ancienne chronique.

Chez celles consultant pour avortement à répétition, sur 13 examinés, 9 avaient une sérologie positive dont 5 positifs à IgM et négatifs à IgG pouvant traduire une infection récente précoce ou une fixation non spécifique d'anticorps de type IgM et 4 positifs à IgM et à IgG ayant un taux faible d'anticorps traduisant ainsi une infection récente active. Il pourrait s'agir là, d'avortements secondaires à la toxoplasmose et pour les 4 cas négatifs, la cause est autre.

Chez celles consultant pour divers motifs (bilan) le seul cas examiné était négatif aux anticorps de type IgM et de type IgG et n'est donc jamais été en contact avec le parasite

Près de 55,76 % des femmes enceintes sont séronégatives et présenteraient un risque de contamination en cours de grossesse.

A la deuxième sérologie, on n'a noté une disparition des anticorps de type IgM chez toutes les sérologies effectuées avec une séroconversion pour 2 cas et une séronégativité pour 3 cas ainsi que la confirmation d'une contamination toxoplasmique chez les 67 autres consultants pour bilan de grossesse par la présence d'anticorps de type IgG à un taux majoritairement inférieur à 50 UI/ml sauf un cas. De même chez les consultants pour avortement à répétition, on a noté un cas de séroconversion sur les 5 suspectés d'infection récente à S1 et une confirmation d'une séropositivité pour les 4 autres permettant de confirmer que la toxoplasmose était la cause de ces avortements. Les taux d'IgG au seuil de ces cas de séroconversion pourraient être dus au traitement entrepris de même que la non évolution de ceux des autres femmes sauf une.

A la troisième sérologie, on n'a noté que toutes les sérologies effectuées étaient positives aux anticorps de type IgG à un taux relativement faible (=10 UI/ml) témoignant de la mémoire immunologique mais aussi, compte tenu des forts taux observés chez 3 sérologies à S2 qui se sont régressés à S3 .Ces résultats préliminaires pourraient attester de l'efficacité du traitement entrepris. Ils sont corroborés par Ajzenberg, qui, en France, en 2010, évaluant l'impact du

traitement chez des patients atteints de SIDA qui faisaient une toxoplasmose cérébrale et ayant reçu le traitement spécifique, était arrivé à ce même constat par l'amélioration notoire des taux de lymphocytes CD4+ comparés à ceux dont la cause de l'immunodépression était autres. Gilbert, 2001, avait démontré que, le traitement de la mère par la Spiramycine, était efficace à cause de la concentration du produit dans le tissu placentaire et son absence d'effet tératogène tant que l'infection fœtale n'est pas prouvée. Cependant, Baden, en 2003, démontré l'efficacité du traitement par le Cotrimoxazole sur la toxoplasmose et d'autres infections opportunistes chez 417 transplantés cardiaques.

Par contre, Couvreur, en 1989 et en 1998, avait démontré que la Spiramycine n'a aucune efficacité sur les lésions fœtales. Aussi Brézin en 2003, McAuley en 1994 et Roizen en 1995 avaient démontré son inefficacité dans le traitement de la toxoplasmose congénitale.

Peu d'études ont été rapportées à ce jour dans le monde. Bien qu'on n'ait pas enregistré de toxoplasmose congénitale, les études de Ndiaye en 2004 situeraient le risque de contamination fœtale à 4,88% c'est-à-dire une grossesse sur mille chez des femmes séronégatives. Ainsi pour parer à cette montée en flèche de cette parasitose chez la femme enceinte, il est plus qu'urgent d'informer toute la population, d'éduquer toutes les femmes enceintes et de sensibiliser tous les praticiens et acteurs sur la maladie qu'est la toxoplasmose, sur la nécessité de laver tous les légumes et fruits avant leur consommation surtout pour la femme enceinte et de bien cuire la viande avant leur consommation par ces dernières. Cependant il y'a lieu de ne pas s'alarmer pour autant car le traitement classique semble efficace à la lumière de cette étude. Ce qui est impératif c'est juste le diagnostiquer à temps pour éviter les complications surtout durant le premier trimestre de grossesse bien que la prévalence de cette toxoplasmose congénitale soit faible. Cependant, il serait intéressant de faire une étude à large échelle, en sélectionnant les patientes, en normalisant les molécules et doses prises et en évaluant le traitement suivant les différentes formes cliniques enregistrées .

En conclusion pour cette partie, nous dirons que le traitement classique basé sur l'administration de la Spiramycine (Rovamycine 3 millions UI) : 1cp x 2/ jour semble efficace à la lumière des résultats obtenus par cette étude. Toutes les patientes séropositives à la toxoplasmose ayant bénéficié du traitement sont guéries avec un taux faible en anticorps de type IgG à 10 UI/ml attestant d'une mémoire immunologique. Mais, par prudence, il serait intéressant d'étendre cela à une population beaucoup plus importante en corroborant le traitement avec les différents cas cliniques de la toxoplasmose pour pouvoir se prononcer définitivement.

II- Identification des souches de Toxoplasma gondii isolées à Dakar

L'objectif du travail que nous allons présenter est de dresser le profil génétique de Toxoplasma gondii à Dakar (Sénégal). Pour s'y faire, les isolats devraient être envoyés en France auprès du Dr Daniel Ajzenberg qui, dans son travail en 2010, avait pour but de savoir entre autres quels sont les génotypes les plus fréquemment rencontrés dans les différentes formes cliniques de toxoplasmose humaine, et en particulier d'établir une corrélation entre certains génotypes et des formes sévères ou atypiques de toxoplasmose. Pour notre part, nous ne considérerons que les cas concernant notre pays, le Sénégal. Ces isolats sont collectés au Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma de Limoge. Nous allons présenter les résultats qu'ils ont obtenus.

II-1-Population d'étude

Elle est constituée de 10 isolats venant de Dakar, adressés au CRB Toxoplasma pour dresser le profil génétique. (Annexe 2).

II-2-Méthodologie

Tous les animaux sont testés au préalable par ADHS. Le sang est prélevé sur tube sec :

- à la veine jugulaire chez les ovins, bovins et poulets (après décapitation)
- dans la cavité cardiaque pour les animaux sauvages tués ou euthanasiés (à défaut la sérologie a pu être faite à partir du fluide cardio-thoracique).

Le parasite est ensuite recherché chez les animaux séropositifs par digestion pepsique du cerveau et/ou du cœur selon la méthode de Dubey (1998c) (annexe 3).

II-3- Typage génétique des toxoplasmes isolés

Le typage génétique des isolats de toxoplasme repose sur l'analyse du polymorphisme allélique de cinq marqueurs microsatellites : TUB2, W35, TgM-A, B18 et B17 (annexe 6) (Ajzenberg et al., 2002a ; 2004 ; 2005). Leur association permet un typage très résolutif qui peut mettre en évidence des recombinaisons alléliques, non détectés par la méthode classique de typage unilocus par SAG2 PCR-RFLP. Le typage est réalisé après amplification des séquences par PCR multiplexe (Ajzenberg et al., 2005) :

- l'ADN est extrait du cerveau ou du liquide d'ascite des souris infectées par les isolats d'origine animale avec le kit QIAamp[®] DNA mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France) (annexe 4 et 5).

- les amorces sont synthétisées par Applied Biosystems (Courtabœuf, France). Pour chaque paire d'amorce, une amorce est couplée à la 6-carboxyfluorescéine (6FAM) ou à l'hexachloro-6-carboxyfluorescéine (HEX) à l'extrémité 5' (annexe 6) afin de déterminer la longueur des produits de PCR sur séquenceur automatique

- la PCR est réalisée avec le QIAGEN[®] Multiplex PCR kit (Qiagen, Courtabœuf, France) : 0,04 μ M de chaque amorce (Roche Diagnostics, Meylan, France), 4 μ l

d'ADN et 6 µl d'eau sont ajoutés dans le Multiplexe Master Mix fourni par QIAGEN (concentration finale 1x) dans un volume total de 25 µl.

- l'amplification est réalisée par un thermocycler GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Courtabœuf) :

- dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min
- 35 cycles d'amplification : 94°C (30 s), 63 ° C (3 min) et 72 ° C (60 s) / cycle
- extension finale à 60 ° C pendant 30 min

- Les produits de PCR sont visualisés, avec un marqueur de poids moléculaire V (Roche Diagnostics, Meylan, France), après électrophorèse sur un gel d'agarose (2% m/v) contenant du bromure d'éthidium (figure 8). Suivant l'intensité des bandes observées, les produits de PCR sont dilués jusqu'au 1/15 dans du formamide désionisé, avant électrophorèse sur séquenceur automatique. Un microlitre de chaque produit dilué est mélangé avec 0,5 µl du marqueur de taille fluorescent GeneScan® ROX 500 (75-500 pb, Applied Biosystems, Courtabœuf) et 23 µl de formamide désionisé. Ce mélange est dénaturé et analysé par électrophorèse sur un gel POP4 de polyacrylamide retenu dans un capillaire (47cm / 50 µm) (Applied Biosystems, Courtabœuf). L'émission de fluorescence est enregistrée par un séquenceur automatique (Abiprism 310 collection 1.0, Applied Biosystems, Courtabœuf) et analysée par le logiciel GeneScan® Analysis version 2.1 (Applied Biosystems, Courtabœuf).

La figure 9 montre le profil de migration obtenu pour un isolat de type II après électrophorèse des produits de PCR sur séquenceur automatique. A chaque pic significatif de fluorescence correspond un allèle et sa longueur en pb. Un génotype est caractérisé par une combinaison particulière d'allèles (annexe 7). Un allèle est souvent commun à plusieurs types, ce qui démontre la nécessité d'une analyse multilocus pour étudier la diversité génétique du toxoplasme.

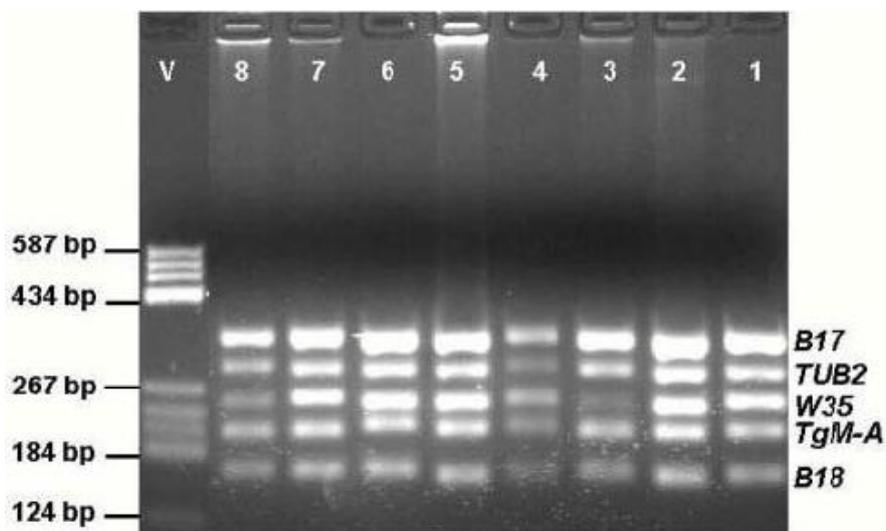


Figure 8 : Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose après amplification de cinq marqueurs microsatellites par PCR multiplexe (Ajzenberg et al., 2005).

Pistes, isolats : 1, BK ; 2, ME49 ; 3, NED ; 4, BOU, 5, DEG ; 6, RMS-2001-MAU ; 7, PSP-2003-KOM ; 8, GUY-2002-MAT ; V, marqueur de poids moléculaire.

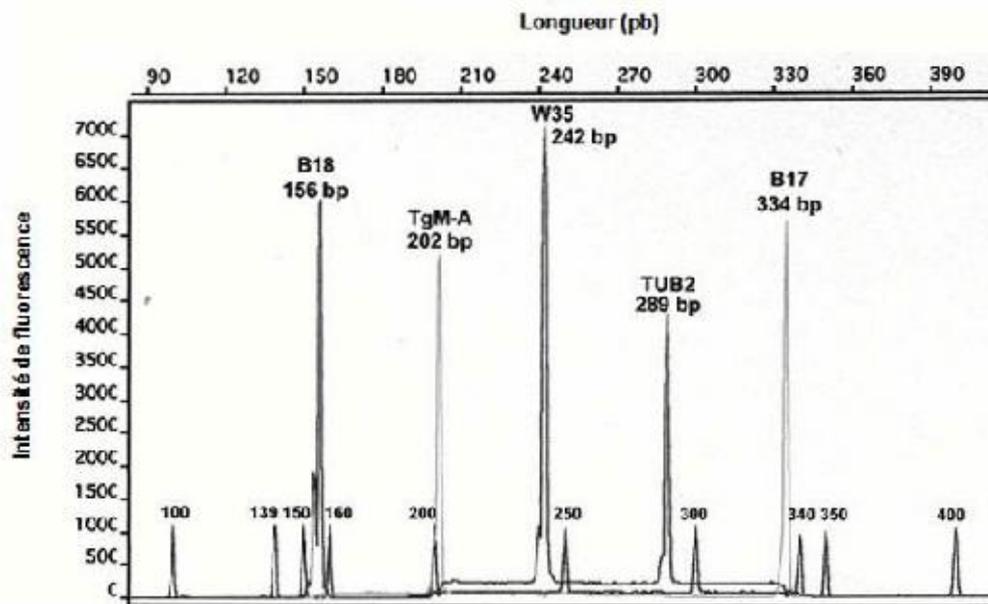


Figure 9 : Exemple d'électrophorèse des produits de PCR multiplexe d'un génotype II (Me49) sur séquenceur automatique (Ajzenberg et al., 2005).

II-4-Résultats

II-4-1-Selon le nombre de Génotype trouvé

Nature du Génotype	Nombre	
	valeur absolue	valeur relative (%)
Type I	0	0
Type II	0	0
Type III	0	0
Type I/II	0	0
Type I/III (Africa 1)	9	90
Type I/II/III (Africa2)	1	10
Type II/III	0	0
Atypique	0	0
TOTAL	10	100

Tableau 14 : Résultat selon le génotype trouvé

Le tableau 14 montre une prédominance du type I/III ou Africa 1 (90 %) et du type I/II/III ou Africa 2 (25 %).

II-4-2-Selon la nature des Génotypes

Quels que soient les marqueurs utilisés, le typage génétique doit être multilocus, c'est-à-dire reposer sur un nombre de loci suffisant pour permettre la détection de recombinaisons alléliques ou d'allèles inhabituels (Dardé, 2004). (Annexe 7).

<u>Souches de référence</u>	MS genotype															Nature Genotype
	TUB2	W35§	TgM-A	B18§	B17§	M33	MIV.1	MXL1	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83	
GT1	291	248 (1)	209	160 (1 ou 3)	342 (1)	169	274	358	209	168	145	119	265	087	306	Type I
ENT*	-	-	-	-	-	-	-	-	209	166	145	121	267	087	308	Type I
B1*	-	-	-	-	-	-	-	-	209	166	147	119	273	087	306	Type I
JONES*	289	242 (2)	207	158 (2)	336 (2 ou 3)	169	274	356	235	174	142	111	265	097	310	Type II
Me49	-	-	-	-	-	-	-	-	215	174	142	111	265	091	310	Type II
PRU*	-	-	-	-	-	-	-	-	209	176	142	117	265	121	310	Type II
CTG	289	242 (3)	205	160 (1 ou 3)	336 (2 ou 3)	165	278	356	215	190	147	111	269	089	312	Type III
NED*	-	-	-	-	-	-	-	-	209	190	147	111	267	091	312	Type III
VEG	-	-	-	-	-	-	-	-	213	188	153	111	267	089	312	Type III
GAB1-2007-FEL-CAT1	-	-	-	-	-	-	-	-	213	190	149	111	267	089	312	Type III
DPHT	291	248 (1)	205	160 (1 or 3)	336 (2 ou 3)	165	274	354	229	166	147	111	283	091	306	Africa 1
TgH 13002 (CCH-2004-NIA)*	289	248 (1)	205	160 (1 ou 3)	336 (2 ou 3)	165	274	354	225	166	145	111	273	089	306	Africa 2
GAB3-2007-GAL-DOM9	291	242 (3)	207	160 (1 ou 3)	342 (1)	165	274	354	229	166	142	111	273	095	310	Africa 3

Tableau 15 : Typage génétique Multilocus microsatellite (MS) issus de 51 isolats de *Toxoplasma gondii* issus de milieux anthropisés et sauvages en Guyane français. (Ajzenberg et al. 2010)

Le tableau 15 montre la nature des 15 marqueurs microsatellites caractéristiques des souches Africa 1 et Africa 2 isolées dans le cadre de cette étude. (**en gras**).

Annotations : Souches de Référence : Type I (GT1, ENT et B1), Type II (JONES, Me49 et PRU), Type III classique (CTG, VEG et NED) Type III (GAB1-2007- 157 FEL-CAT1) et souche Africa 3 (GAB3-2007-GAL-DOM9), récentes originaire du Gabon et Souches Africa 1 (DPHT) et Africa 2 (TgH 13002) isolées dans cette étude

- : Identique aux valeurs au dessus

*: Souche de référence obtenues Centre de Recherches en Biologie Toxoplasmique de Limoge

§: Les chiffres relatifs au typage classique ont été ajustées après le séquençage du W35, B17 et B18 marqueurs

() : Polymorphisme allélique de ces 3 marqueurs sont exprimés en nombres relatifs au typage classique de *T. gondii*: allèles 1.

2, 3 sont réservés aux lignées clonales I, II et III; allèle 1 ou 3 signifie que les types I et III partager l'allèle; allèle 2 ou 3 signifie que les types II et III part l'allèle. Les chiffres supérieurs correspondent à des allèles non classiques (atypiques) et tiennent compte de l'ajustement de séquençage

II-5-Discussion

Dans notre étude, 10 isolats sur 10 ont un génotype recombinant type I/III ou Africa 1 et type I/II/III ou Africa 2, alors que les isolats appartenant aux trois lignées clonales sont minoritaires (type III : 0/10 ; type II : 0/10 et type I : 0/10). Les isolats correspondants ont été isolés en France. Ces génotypes recombinants présentent de façon caractéristique un mélange d'allèles de type I avec des allèles de type III. Ainsi ces quelques isolats indiquent la circulation au Sénégal de génotypes recombinants I/III et I/II/III (Ajzenberg *et al.*, 2004; Ajzenberg *et al.*, 2009), désignés respectivement sous les termes d'*Africa 1* et *Africa 2*. Il se peut que le génotype *Africa 1*, qui a principalement été détecté chez des patients immunodéprimés d'Afrique de l'Ouest et centrale soit une lignée clonale (Ajzenberg *et al.*, 2009). Ce génotype I / III a déjà été isolé au Brésil chez des poulets ou au Portugal dans des cas de toxoplasmose congénitale. Ce génotype dit « africain » pourrait représenter une nouvelle lignée clonale, comme nous l'avons suggéré dans la première partie. Le fait de retrouver ce même génotype I/III dans plusieurs isolats brésiliens plaide en faveur de cette hypothèse (Pena *et al.*, 2008; Ajzenberg, 2006). De même, Dubey et collaborateurs avaient déjà décrit 2 souches polonaises recombinantes I/II/III (Dubey *et al.* 2008a). Aurélien Mercier a décrit ce génotype (*Africa 1*) au Gabon en 2010 et un nouveau type pour l'Afrique *Africa 3*.

En ce qui concerne l'Afrique tropicale, Velmurugan et collaborateurs, [Kenya, Nigeria, Congo, Mali, Burkina Faso, et Ghana ; (Velmurugan *et al.*, 2008)], et Lindström et collaborateurs, [Ouganda ; (Lindström *et al.*, 2008)] suggèrent que, comme en Europe et aux USA, les Types I, II et III circuleraient avec de possibles recombinants II/III (Lindström Bontell *et al.*, 2009), bien que des génotypes différents des précédents aient été rapportés (Ajzenberg *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2006).

En Amérique centrale et du Sud, les Types I, II et III sont rares (Dubey *et al.*, 2008d; Dubey *et al.*, 2010a) et sont remplacés par différents haplogroupes, certains étant considérés comme clonaux : BrI, BrII, BrIII et BrIV (Pena *et al.*, 2008). Parmi les 11 haplotypes proposés par (Khan *et al.*, 2007), 6 sont présents en Amérique du Sud (haplotypes 4, 5, 6b, 8, 9 et 10). Ces groupes ont pu être définis grâce aux nombreuses études qui ont échantillonné ces régions d'Amérique du Sud, ce qui n'empêche pas encore actuellement de trouver de nouveaux génotypes (Dubey *et al.*, 2010a; Ragozo *et al.*, 2010). La plus grande diversité observée en Amérique du Sud et la plus notable se trouve dans la région amazonienne (Dubey *et al.*, 2007a; Ajzenberg *et al.*, 2004; Carme *et al.*, 2009a), avec une grande quantité de souches atypiques en Guyane Française inféodées au milieu sauvage.

Dans les îles des Caraïbes qui présentent aussi un climat tropical humide, (Dubey *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2007d) ont relevé la présence des Types I, II et III associée à des génotypes non archétypaux sur les îles de Saint-Kitts-et-Nevis, et de Mona Island (Porto Rico). De même, Ajzenberg et collaborateurs font état d'un même génotype recombinant I/III avec un locus atypique (*Caribbean I*) isolé chez des patients de l'île de la Guadeloupe ou de la Martinique. Il propose ce génotype comme pouvant être une lignée majeure dans les Caraïbes (Ajzenberg *et al.*, 2009).

Dans l'Océan Indien, sur l'île de la Réunion, une souche atypique a été décrite comme étant un génotype atypique avec des allèles de Type II et III (Marie-Laure Dardé, CRB *Toxoplasmique*, communication personnelle, 2004).

Enfin, en Asie tropicale, le peu d'études effectuées confirment ce qui a été observé en Chine (Zhou *et al.*, 2009) avec une diversité légèrement plus grande. Au Sri Lanka (Dubey *et al.*, 2007e), le Type II est rapporté associé à 3 nouveaux génotypes dont le génotype #3 décrit plus tard par Zhou et collaborateurs (Zhou *et al.*, 2009). Il pourrait peut-être lui aussi former une lignée clonale majeure au vu de sa représentation en Asie et sur le continent américain (Zhou *et al.*, 2009). Au Viêtnam, Dubey et collaborateurs ont trouvé les deux mêmes génotypes qu'en Chine dont le génotype #3 (Dubey *et al.*, 2007g; Dubey *et al.*, 2008a; Dubey *et al.*, 2007c). Enfin, une souche recombinante I/III a été décrite en Indonésie (Dubey *et al.*, 2008a). Comme l'Afrique tropicale, l'Asie tropicale reste encore à explorer, notamment en ce qui concerne la faune sauvage. En Nouvelle Calédonie, ce sont deux souches de Type III qui ont été décrites (Marie-Laure Dardé, CRB *Toxoplasmique*, communication personnelle).

On voit ainsi, que les trois lignées, Type I, II et III, gardent une répartition assez restreinte et ne sont au final sans doute que des lignées majeures parmi tant d'autres en cours de caractérisation ou restant à découvrir.

De façon générale, il est difficile de comparer toutes ces études de génotypage entre elles, en raison de l'utilisation de multiples marqueurs souvent différents d'une étude à l'autre. Il sera donc nécessaire à l'avenir d'envisager une synthèse globale de toutes ces souches, qui utilisera l'ensemble des marqueurs (RFLP, microsatellites, séquençage) et qui permettra de résoudre en partie la structure globale du toxoplasme. De plus, il ne faut pas perdre de vue que l'analyse de cette structure géographique reste actuellement préliminaire et n'est pas figée, dépendant des découvertes de nouveaux isolats à venir et de la qualité de l'échantillonnage prenant en compte les différents milieux sauvages et domestiques. Cette approche a jusqu'ici été peu abordé.

En conclusion pour cette partie, nous dirons que les génotypes retrouvés à Dakar (Sénégal) sont des génotypes recombinants avec majoritairement Africa 1 ou Type I/III et Africa 2 ou Type I/II/III. Ces deux types sont conservés au CRB Toxoplasma de Limoge comme souches de référence. Cependant, compte tenu de la taille faible de la population d'étude, il serait prématuré d'affirmer que ceux sont les seules souches qui circulent dans le pays. Il serait donc intéressant de faire un échantillonnage plus conséquent auprès de tous les hôtes impliqués pour caractériser le polymorphisme génétique de *Toxoplasma gondii* au Sénégal. Aussi, faire une corrélation entre les génotypes trouvés et les différentes formes cliniques rencontrées serait d'une importance capitale pour notre pays.

Conclusion Générale **et Recommandations**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La toxoplasmose est une affection parasitaire extrêmement fréquente et transmise par les animaux familiers, essentiellement le chat. Causée par le protozoaire *Toxoplasma gondii*, elle est transmise à l'homme soit par voie orale (nourriture contaminée), soit congénitale et moins fréquemment soit par contact avec des produits sanguins contaminés ou par greffe. Elle est souvent latente chez l'enfant et l'adulte mais redoutable pour le fœtus, le nouveau-né et le sujet immunodéprimé. Elle se manifeste en général par une lymphadénopathie et une fièvre auto-limitante. Chez la femme enceinte, elle peut entraîner une atteinte nerveuse du fœtus et parfois l'avortement.

L'objectif général de ce travail était de déterminer la séroprévalence de la toxoplasmose chez certains animaux domestiques (Chien et chat) et chez la femme du 1er Janvier au 30 Novembre 2012, d'étudier l'efficacité de la Spiramycine dans le traitement de la toxoplasmose et d'identifier les souches isolées à Dakar (Sénégal) en rapport avec les souches de référence provenant essentiellement de cas humains.

Le test immunoenzymatique en phase solide d'Orgenics SA (Immunocombs) chez la femme (179 cas) et le test d'agglutination direct sur plaque Pastorex Toxo-latex BIO-RAD chez le chat (50 cas) et le chien (20 cas) avec respectivement un seuil de 10 et 6 UI/ml avaient été utilisés sur les sérums.

Le typage des souches d'analyse de génotypage a été effectué par PCR en utilisant le polymorphisme de la longueur de 15 marqueurs microsatellites dans un essai multiplex modifié après extraction de l'ADN.

Elle révèle une séroprévalence de $25 \pm 18,98\%$ chez le chien, de $70 \pm 12,70\%$ chez le chat et de $45,81 \pm 7,30\%$ chez la femme avec $44,24 \pm 7,58\%$ chez celle enceinte.

L'efficacité du traitement actuel a été démontrée par retour à un taux faible en anticorps de type IgG à 10 UI/ml chez celles ayant reçu de la Rovamycine 3 millions UI à une dose de 1cp x 2/ jour pendant un mois.

Le typage des souches d'analyse de génotypage effectué sur 10 isolats par PCR en utilisant le polymorphisme de la longueur de 15 marqueurs microsatellites dans un essai multiplex modifié a montré que les Génotypes Africa 1 ou type I/III (90 %) et Africa 2 ou type I/II/III (10%) circulent à Dakar au Sénégal.

Cette étude montre une forte prévalence sérologique de la toxoplasmose chez la femme enceinte et ses animaux de compagnie (chien et chat)

Au regard de cette montée fulminante du taux de prévalence, nous recommandons de :

- 1- Faire une étude de séroprévalence nationale sur un échantillonnage plus important chez la femme et chez tous les animaux susceptibles d'être contaminés (Enseignants, Chercheurs, épidémiologistes, Médecins).
- 2- Mettre sur pied un programme national de lutte contre la toxoplasmose (Ministère de la Santé)
- 3- Caractériser les différentes souches circulant au Sénégal sur un échantillon plus grand (Enseignants, Chercheurs).
- 4- Procéder à une corrélation des différentes souches circulantes au Sénégal avec les différentes formes cliniques surtout chez les femmes enceintes et les sujets immunodéprimés (Enseignants, Chercheurs, Médecins, Généticiens).

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

Publications

1-NDIAYE A, NDIAYE D, SALL N.D., SOW D., NDIAYE J.L., DIENG Y., GAYE O, NDIR O, SEMBENE P. MB. "Actuality of Seroprevalence of toxoplasmosis in women, dog and cat in Dakar in 2012", 01 juillet 2013 publié par Open Science Repository Medicine, doi 10.7392 / openaccess. 70081980

2-Ndiaye A., Ndiaye D., SEMBENE P.MB. SAMBA O. « Etude de l'efficacité de la Spiramycine dans le traitement de la toxoplasmose chez la femme enceinte au Centre d'Analyses de Biologie Médicale du Centre Hospitalier Abass NDAO en 2012 », 19 juin 2013 publié par Open Science Repository Medicine, doi 10.7392/openaccess.70081973

3-Ndiaye A. «Toxoplasmose à Dakar : Bilan des examens sérologiques de la toxoplasmose au Centre d'Analyse de Biologie Médicale du Centre hospitalier ABASS NDAO. Etude effectuée sur 231 prélèvements pour 209 patients, publiée par les Presses Académiques Francophones, Mars 2013, ISBN-13 :978-3- 8381-7867-7

4-Ndiaye, D.; Ndiaye, A.; Sene, P. D.; Faye, B.; Ndir, O., «Bilan des examens sérologiques de la toxoplasmose au laboratoire de parasitologie-Mycologie de l'hôpital Aristide A. Le Dantec. Etude effectuée sur 122 prélèvements »Thèse de doctorat d'état en pharmacie, Janvier 2004, publié en 2007 par Dakar Médical, 2ème auteur.

Communications orales :

1- Ndiaye A « La Toxoplasmose humaine en Santé publique.»Dakar le 30/06/2012

à l'EISMV/AFRIQUEONE.

2-Ndiaye A. «Caractérisation génétique de *Toxoplasma gondii* et chimiosensibilité médicamenteuse ».Poster, Doctoriales Janvier 2012, UCAD II, Dakar –Sénégal.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDREE PRISCA NDJOUG NDOUR « Analyse du risque de transmission de *Toxoplasma gondii* à la femme dans la région de Dakar (SENEGAL) » Mémoire de Master en Santé Publique Vétérinaire, 2012 .

ADJE K.J.F.. Séroprévalence et facteurs de risque de la toxoplasmose et de la néosporose chez la femme en consultation prénatale et chez les carnivores domestiques dans la ville de Kaolack (Sénégal). : *Mémoire épidémiologie : Dakar (EISMV), 2012, N° 9.*

AFNOR. Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* – Méthode de concentration et de dénombrement NF T90-455 Juillet 2001, Saint-Denis La Plaine. Association Française de Normalisation, France

ALLANONTO V. Séroprévalence et facteurs de risque de la toxoplasmose et de la néosporose chez la femme en consultation prénatale et chez les carnivores domestiques dans la ville de Kaolack (Sénégal). : *Mémoire épidémiologie : Dakar (EISMV), 2012. N° 8.*

AJZENBERG , D. Apport des microsatellites et du Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma* à l'épidémiologie moléculaire de *Toxoplasma gondii*. Thèse de doctorat. Biologie- Sciences-Santé, Faculté de Médecine de Limoges, Limoges, (2006). 161 p.

AJZENBERG, D., BAÑULS, A.L., SU, C., DUMÈTRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDÉ M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 1185-1196

AJZENBERG, D., BAÑULS, A.L., TIBAYRENC, M., DARDÉ, M.L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.*, 2002a, 32, 27-38

AJZENBERG, D., COGNÉ, N., PARIS, L., BESSIÈRES, M.H., THULLIEZ, P., FILISETTI, D., PELLOUX, H., MARTY, P., DARDÉ, M.L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.*, 2002b, 186, 684-689

AJZENBERG, D., DUMÈTRE, A., DARDÉ, M.L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43, 1940-1943

AJZENBERG D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2010 Sep 29

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

ANONYME , 1997. Cyclospora cayetanensis protocol: concentration and preparation of oocysts from produce for the polymerase chain reaction (PCR) and microscopy. [URL www.cfsan.fda.gov/~mow/cyclmet.html]

AURELIEN MERCIER .Approche écologique, épidémiologique et génétique de la biodiversité de *Toxoplasma gondii* en zone tropicale humide : exemples du Gabon et de la Guyane Française .Thèse de doctorat d'état en Biologie Science Santé, Spécialité : Ecologie-Parasitologie de l'Université de Limoge, soutenue le 23 novembre 2010.

ARAMINI, J.J., STEPHEN, C., DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J. Parasitol.*, 1998, 84, 438-440

ARAMINI, J.J., STEPHEN, C., DUBEY, J.P., ENGELSTOFT, C., SCHWANTJE, H., RIBBLE, C.S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol. Infect.*, 1999, 122, 305-315

ARKUSH, K.D., MILLER, M.A., LEUTENEGGER, C.M., GARDNER, I.A., PACKHAM, A.E., HECKEROTH, A.R., TENTER, A.M., BARR, B.C., CONRAD, P.A. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.*, 2003, 33, 1087-1097

ASPINALL, T.V., MARLEE, D., HYDE, J.E., SIMS, P.F. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction - food for thought ? *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 1193-1199

BADEN LR, Katz JT, Franck L, Tsang S, Hall M, Rubin RH, Jarcho J. Successful toxoplasmosis prophylaxis after orthotopic cardiac transplantation with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Transplantation*. 2003;75:339-43.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M., JONES, J.L., AZEVEDO-SILVA, J., ALVES, C.C., OREFICE, F., ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, 9, 55-62

BARIL, L., ANCELLE, T., GOULET, V., THULLIEZ, P., TIRARD-FLEURY, V., CARME, B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy : A case control study in France. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1999, 31, 305-309

BELLI, S.I., WALLACH, M.G., LUXFORD, C., DAVIES, M.J., SMITH, N.C. Roles of tyrosine-rich precursor glycoproteins and dityrosine- and 3,4 dihydroxyphénylalanine-mediated protein cross-linking in development of the oocyst wall in the coccidian *Eimeria maxima*. *Eukaryot. Cell.*, 2003, 2, 456-464

BENENSON, M.W., TAKAFUJI, E.T., LEMON, S.M., GREENUP, R.L., SULZER, A.J. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.*, 1982, 307, 666-669

BERGER F., Goulet V., Le Strat Y., De Valk H., Desenclos J.C. « La toxoplasmose en France chez la femme enceinte en 2003 : séroprévalence et facteurs associés » Saint-Maurice : Institut de Veille Sanitaire, coll. « Maladies Infectieuses », 42 p. (*ISSN 1956-6956*)

BERLIN, O.G.W., PETER, J.B., GAGNE, C., CONTEAS, C.N., ASH, L.R. Autofluorescence and the detection of *Cyclospora* oocysts. *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, 4, 127-128

BIANCIFIORI, F., RONDINI, C., GRELLONI, V., FRESCURA, T. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1986, 9, 337-346

BLACKSTON, C.R., DUBEY, J.P., DOTSON, E., SU, C., THULLIEZ, P., SIBLEY, D., LEHMANN, T. High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. *J. Parasitol.*, 2001, 87, 1472-1475

BOBIC, B., Jevremovic, I., Marinkovic, J., Sibalic, D. and Djurkovic-Djakovic, O. (1998) Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur J Epidemiol*, 14, 605-610.

BONNIN, A., DUBREMETZ, J.F., CAMERLYNCK, P. A new antigen of *Cryptosporidium parvum* micronemes possessing epitopes cross-reactive with macrogamete granules. *Parasitol. Res.*, 1993, 79, 8-14

BOSSI, P., CAUMES, E., PARIS, L., DARDE, M.L., BRICAIRE, F. *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36, 3724-3725

BOWIE, W.R., KING, A.S., WERKER, D.H., ISAAC-RENTON, J.L., BELL, A., ENG, S.B., MARION, S.A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, 1997, 350, 173-177

BRECHT, S., CARRUTHERS, V.B., FERGUSON, D.J.P., GIDDINGS, O.K., WANG, G., JÄKLE, U., HARPER, J.M., SIBLEY, L.D., SOLDATI, D. The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 4119-4127

BREZIN AP, Thulliez P, Couvreur J, Nobre R, Mcleod R, Mets MB. Ophthalmic outcomes after prenatal and postnatal treatment of congenital toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 2003;135:779-84.

BUKHARI, Z., McCuin, R.M., FRICKER, C.R., CLANCY, J.L. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 4495-4499

CABANNES, A., LUCCHESI, F., HERNANDEZ, J.C., PELSE, H., BIESEL, N., EYMONNOT, M., APPRIOU, M., TRIBOULEY-DURET, J. Enquête

- séroépidémiologique sur *Toxoplasma gondii* chez les ovins, bovins et félins dans le département de la Gironde. Bull. Soc. Fr. Parasitol., 1997, 15, 11-22
- CALLOT, J., KREMER, M., GBETRO, L., CRANZ, G. Etude sérologique de l'incidence de la toxoplasmose chez les animaux de boucherie de Strasbourg. Rev. Tech. Vet. Abattoir Hyg. Alimentaire, 1970, 8, 30
- CAMPANA-ROUGET, Y., LEVITTE, F. La toxoplasmose chez les herbivores en Côtes d'Or. Rev. Med. Vet., 1975, 125, 99-104
- CAREY, C.M., LEE, H., TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Res., 2004, 38, 818-862
- CARME, B., D. Ajzenberg, M. Demar, S. Simon, M. L. Dardé, B. Maubert, and B. de Thoisy. 2009. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. Vet. Parasitol. 163:132-135.
- CARME, B., BISSUEL, F., AJZENBERG, D., BOUYNE, R., AZNAR, C., DEMAR, M., BICHAT, S., LOUVEL, D., BOURBIGOT, A.M., PENEAU, C., NERON, P., DARDÉ, M.L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J. Clin. Microbiol., 2002, 40, 4037-4044
- CHABASSE, D., ROBERT, R., LAVAU, M., LAHAN, R., HOCQUET, P. Etude épidémiologique de la toxoplasmose animale et humaine en Maine et Loire. Archives Méd. de l'Ouest, 1978, 10, 697-705
- CHANTON-GREUTMANN, H., THOMA, R., CORBOZ, L., BOREL, N., POSPISCHIL, A. Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996-1998) with special reference to chlamydial abortions. Schweiz Arch. Tierheilkd., 2002, 144, 483-492
- CHESNOT, T., SCHWARTZBROD, J. Quantitative and qualitative comparison of density-based purification methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts in turbid environmental matrices. J. Microbiol. Methods, 2004, 58, 375-386
- CHRISTIE, E., PAPPAS, P.W., DUBEY, J.P. Ultrastructure of excystation of *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Protozool., 1978, 25, 438-443
- COLE, R.A., LINDSAY, D.S., HOWE, D.K., RODERICK, C.L., DUBEY, J.P., THOMAS, N.J., BAETEN, L.A. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). J. Parasitol., 2000, 86, 526-530
- COOK, A.J., GILBERT, R.E., BUFFOLANO, W., ZUFFEREY, J., PETERSEN, E., JENUM, P.A., FOULON, W., SEMPRINI, A.E., DUNN, D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a european multicentre case-control study. Br. Med. J., 2000, 321, 142-147

CORONA-VASQUEZ, B., SAMUELSON, A., RENNECKER, J.L., MARÍÑAS, B.J. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Water Res.*, 2002, 36, 4053-4063

COULIBALY F. Séroprévalence et facteurs de risque de la toxoplasmose et de la néosporose chez la femme en consultation prénatale et chez les carnivores domestiques dans la ville de Dakar (Sénégal). *Mem. Epid. EISMV(Dakar)*, 2012, N°15.

COUTINHO, S.G., LOBO, R., DUTRA, G. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil. *J. Parasitol.*, 1982, 68, 866-868

COUVREUR J, Leport C. *Toxoplasma gondii* in : Antimicrobial Therapy and vaccines, Yu V.L., Merignac T.C., Barriere S.L.(ed) Williams & Wilkins. 1998;600-612.

COUVREUR J., Thulliez Ph. Devenir des toxoplasmoses congénitales. *J Pédiatrie et de Puériculture*. 1989;2:80-88.

DA SILVA, D.S., BAHIA-OLIVEIRA, L.M., SHEN, S.K., KWOK, O.C., LEHMANN, T., DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. *J. Parasitol.*, 2003, 89, 394-396

DALTON, C., GOATER, A.D., PETHIG, R., SMITH, H.V. Viability of *Giardia intestinalis* and viability and sporulation state of *Cyclospora cayentanensis* oocysts determined by electrorotation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 586-590

DARDÉ, M.L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Inst. Super. Sanita.*, 2004, 40, 57-63

DARDÉ, M.L., BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.*, 1992, 78, 786-794

DARDÉ, M.L., VILLENA, I., PINON, J.M., BEGUINOT, I. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36, 324

DAVIES, C.M., KAUCNER, C., DEERE, D., ASHBOLT, N.J.. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium parvum* from animal fecal matrices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 2842-2847

DAVIS, S.W., DUBEY, J.P. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 882-886

DEMAR, M., AJZENBERG, D., MAUBON, D., PUNWASI, W., VALERY, N., PENEAU, C., COTTRELLE, B., DJOSSOU, F., DAIGRE, J.L., AZNAR, C., TERZAN, L., DARDÉ, M.L., CARME, B. Epidémie de toxoplasmose aiguë sévère en région frontalière franco-surinamienne. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2005, 98, 63

- DENIAU M. Leke R. J., Same Ekobo « La toxoplasmose dans la province du centre : bilan des trois années d'activités au CHU de Yaoundé », *Ann.Univ.Sci.Santé* (1), 1985,22-25
- DESMONTS, G., REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, 1980, 11, 562-568
- DI GIORGIO, C.L., GONZALEZ, D.A., HUITT, C.C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 5952-5955
- DI GIOVANNI, G.D., HASHEMI, F.H., SHAW, N.J., ABRAMS, F.A., LECHEVALLIER, M.W., ABBASZADEGAN, M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 3427-3432
- DIALLO S., Ndir O, Dieng Y, Leye A., Dieng T « Séroprévalence de la toxoplasmose à Dakar (Sénégal) en 1993. Etude chez des femmes en période de procréation » *Cah, Santé*, 1996, 6,102-106.
- DOBY, J., DEUNFF, J. Toxoplasmose des herbivores d'élevage en Bretagne. *Recueil de médecine vétérinaire de l'Ecole d'Alfort*, 1984, 160, 101-106
- DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and coccidiosis : a survey of domiciled and stray cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1973, 162, 873-877
- DUBEY, J.P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature*, 1976, 262, 213-214
- DUBEY, J.P. Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kitten. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1977, 170, 538-540.
- DUBEY, J.P. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, 41, 427-429
- DUBEY, J.P. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *J. Parasitol.*, 1992, 78, 151-153
- DUBEY, J.P. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *J. Parasitol.*, 1996a, 82, 951-956
- DUBEY, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.*, 1996b, 82, 957-961
- DUBEY, J.P. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology*, 1998a, 116, 43-50
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.*, 1998b, 84, 862-865

- DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.*, 1998c, 74, 75-77
- DUBEY, J.P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol.*, 2001, 87, 315-219
- DUBEY, J.P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Parasitol.*, 2002a, 88, 713-717
- DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet. Parasitol.*, 2002b, 106, 121-153
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, 2004, 126, 57-72
- DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1988, 220 p.
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 1972, 19, 155-177
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J. Parasitol.*, 1973, 59, 505-512
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. *Vet. Path.*, 1974, 11, 350-379
- DUBEY, J.P., SHARMA, S.P. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.*, 1980, 66, 111-114
- DUBEY, J. P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Bandini, L. A., Kwok, O. C., Hill, R. and Su, C. (2007a) 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
- DUBEY, J. P., Chellaiah, R., Costa, D. G., Ferreira, L., Kwok, O., Qu, D., Su, C., Marvulo, M., Alves, L. and Mota, R. (2010a) New *Toxoplasma Gondii* Genotypes Isolated from Free-Range Chickens from the Fernando De Noronha, Brazil: Unexpected Findings. *J Parasitol*, 1.
- DUBEY, J.P., EDELHOFER, T., MARCET, P., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H., LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Vet Parasitol.*, 2005, in press
- DUBEY JP, Gennari SM, Sundar N, et al. Génotypes variés et atypiques identifiés dans *Toxoplasma gondii* de chiens à Sao Paulo, au Brésil. *J Parasitol* 2007d; 93:60-4.
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., BLACKSTON, C.R., LEHMANN, T., GENNARI, S.M., RAGOZO, A.M., NISHI, S.M., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., HILL, D.E., THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from

chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 99-105

DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DA SILVA, D.S., LEHMANN, T., BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype and oocyst shedding by cats. *J. Parasitol.*, 2003a, 89, 851-853

DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DAHL, E., HILALI, M., EL-GHAYSH, A., SREEKUMAR, C., KWOK, O.C.H., SHEN S.K., LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. *Vet. Parasitol.*, 2003b, 30, 89-95

DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., LEHMANN, T., DAVIS, M.F., MORISHITA, T.Y. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from the United States. *J. Parasitol.*, 2003c, 89, 1060-1062

DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DE YOUNG, R.W., DAHL, E., EBERHARD, M.L., NACE, E.K., WON, K., BISHOP, H., PUNKOSDY, G., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C.B., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., SUMNERS, J.A., DEMARAIS, S., HUMPHREYS, J.G., LEHMANN, T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J. Parasitol.*, 2004, 90, 67-71

DUBEY, J. P., Huong, L. T., Lawson, B. W., Subekti, D. T., Tassi, P., Cabaj, W., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Kwok, O. C. and Su, C. (2008a) Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. *J Parasitol*, 94, 68-71.

DUBEY, J. P., Huong, L. T., Sundar, N. and Su, C. (2007c) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. *Vet Parasitol*, 146, 347-351.

DUBEY, J.P., HOOVER, E.A., WALLS, K.W. Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 1977, 24, 184-186

DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., THAYER, D.W., KWOK, O.C., SHEN, S.K. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *J. Parasitol.*, 1996, 82, 724-727

DUBEY, J.P., KARHEMERE, S., DAHL, E., SREEKUMAR, C., DIABATE, A., DABIRÉ, K.R., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H., LEHMANN, T. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *J. Parasitol.*, 2005, 91, 69-72

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, 11, 267-299

- DUBEY, J. P., Lopez-Torres, H. Y., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Ajzenberg, D., Kwok, O. C., Hill, R., Dardé, M. L. and Su, C. (2007d) Mouse-virulent *Toxoplasma gondii* isolated from feral cats on Mona Island, Puerto Rico. *J Parasitol*, 93, 1365-1369.
- DUBEY, J.P., LUNNEY, J.K., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., ASHFORD, D.A., THULLIEZ, P. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J. Parasitol.*, 1996, 82, 438-443
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1970a, 56, 447-456
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.*, 1970b, 132, 636-662
- DUBEY, J. P., Moura, L., Majumdar, D., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Kwok, O. C., Kelly, P., Krecek, R. C. and Su, C. (2009) Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. *Parasitology*, 136, 589-594.
- DUBEY, J.P., MORALES, E.S., LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J. Parasitol.*, 2004, 90, 411-413
- DUBEY, J.P., NAVARRO, I.T., GRAHAM, D.H., DAHL, E., FREIRE, R.L., PRUDENCIO, L.B., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C., LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2003, 117, 229-234
- DUBEY, J.P., NAVARRO, 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. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.*, 2004, 90, 721-726
- DUBEY, J. P., Rajapakse, R. P., Wijesundera, R. R., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Kwok, O. C. and Su, C. (2007e) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Sri Lanka and genetic characterization of the parasite isolates. *Vet Parasitol*, 146, 341-346.
- DUBEY, J.P., RUFF, M.D., CAMARGO, M.E., SHEN, S.K., WILKINS, G.L., KWOK, O.C., THULLIEZ, P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, 54, 1668-1672
- DUBEY, J.P., SALANT, H., SREEKUMAR, C., DAHL, E., VIANNA, M.C.B., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., SPIRA, D., HAMBURGER, J., LEHMANN, T.V. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. *Vet. Parasitol.*, 2004, 121, 317-322

- DUBEY, J.P., SAVILLE, J.A., STANEK, J.F., REED, S.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *J. Parasitol.*, 2002, 88, 802-803
- DUBEY, J.P., SPEER, C.A., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., BLIXT, J.A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.*, 1997, 83, 870-882
- DUBEY, J.P., SWAN, G.V., FRENKEL, J.K. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from the cat feces. *J. Parasitol.*, 1972, 1005-1006
- DUBEY, J.P., THAYER, D.W., SPEER, C.A., SHEN, S.K. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int. J. Parasitol.*, 1998, 28, 369-375
- DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., POWELL, E.C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows : comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 48-53
- DUBEY, J. P., Velmurugan, G. V., Chockalingam, A., Pena, H. F., de Oliveira, L. N., Leifer, C. A., Gennari, S. M., Bahia Oliveira, L. M. and Su, C. (2008d) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol.*, 157, 299-305.
- DUBEY, J.P., WEIGEL, R.M., SIEGEL, A.M., THULLIEZ, P., KITRON, U.D., MITCHELL, M.A., MANNELLI, A., MATEUS-PINILLA, N.E., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., TODD, K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 723-729
- DUBEY, J.P., ZARNKE, R., THOMAS, N.J., WONG, S.K., VAN BONN, W., BRIGGS, M., DAVIS, J.W., EWING, R., MENSE, M., KWOK, O.C.H., ROMAND, S., THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol.*, 2003a, 116, 275-296
- Dubey, J. P., Zhu, X. Q., Sundar, N., Zhang, H., Kwok, O. C. and Su, C. (2007g) Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. *Vet Parasitol.*, 145, 352-356.
- DUMÈTRE, A., DARDÉ, M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples ? *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, 27, 651-661
- DUMÈTRE, A., DARDÉ, M.L. Purification of *Toxoplasma gondii* oocysts by cesium chloride gradient. *J. Microbiol. Methods*, 2004, 56, 427-430
- DUNCANSON, P., TERRY, R.S., SMITH, J.E. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.*, 2001, 31, 1699-1703
- ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E.A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int. J. Parasitol.*, 1998, 28, 1459-1466

- ESTEBAN-REDONDO, I., MALEY, S.W., THOMSON, K., NICOLL, S., WRIGHT, S., BUXTON, D., INNES, E.A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet. Parasitol.*, 1999, 86, 155-171
- EYLES, D.E., GIBSON, C.L., COLEMAN, N., SMITH, C.S., JUMPER, J.R., JONES, F.E. The prevalence of toxoplasmosis in wild and domesticated animals of the Memphis region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1959, 8, 505-510
- FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, 44, 189-204
- Faye O., Leye A., Dieng Y, Richard-Lenoble D. et Diallo S. « La toxoplasmose à Dakar. Sondage séroépidémiologique chez 353 femmes en âge de procréer », *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1998, 91,249-250.
- FAYER, R., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol.*, 2004, 20, 531-536
- FAYER, R., GRACZYK, T.K., LEWIS, E.J., TROUT, J.M., FARLEY, C.A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 1070-1074
- FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii* and sex : essential or optional extra ? *Trends Parasitol.*, 2002, 18, 355-359
- FERGUSON, D.J.P. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 347-360
- FERGUSON, D.J.P., BRECHT, S., SOLDATI, D. The microneme protein MIC4, or an MIC4-like protein, is expressed within the macrogamete and associated with oocyst wall formation in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30, 1203-1209
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., SIIM, J.C. Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1974, 82, 167-181
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M., SIIM, L.C. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1975, 83, 491-505
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., SIIM, J.C. The effect of endo-enteric development of *Toxoplasma gondii* on the ultrastructure of epithelial cells of the small intestine of infected cat. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1976, 84, 189-195
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. I.

- Development of the zygote and formation of the sporoblasts. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979a, 87, 171-181
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. II. Formation of the sporocyst and structure of the sporocyst wall. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979b, 87, 183-190
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M.. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979c, 87, 253-260
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979d, 87, 277-283
- FLECK, D.G., CHESSUM, B.S., PERKINS, M. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *B.M.J.*, 1972, 3, 111-112
- FREIRE-SANTOS, F., OTEIZA-LÓPEZ, A.M., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A., ARES-MAZÁS, E. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Vet. Parasitol.*, 2000a, 89, 253-259.
- FREIRE-SANTOS, F., OTEIZA-LÓPEZ, A.M., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A., ARES-MAZÁS, E., ALVAREZ-SUÁREZ, E., GARCÍA-MARTÍN, O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *J. Parasitol.*, 2000b, 86, 853-854
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J. Infect. Dis.*, 1972, 126, 664-673
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasitol.*, 1973, 59, 587-588
- FRENKEL, J.K., SMITH, D.D. Immunization of cats against shedding of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1982, 68, 744-748
- FRENKEL, J.K., HASSANEIN, K.M., HASSANEIN, R.S., BROWN, E., THULLIEZ, P., QUINTERO-NUNEZ, R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 53, 458-468
- FRENKEL, J.K., RUIZ, A., CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 24, 439-443

- FREYRE, A., FALCON, J. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Exp.Parasitol.*, 2004, 107, 72-77
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCON, J., CASTELLS, D., CORREA, O., CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, 1997, 73, 13-15
- FROSTEGARD, A., COURTOIS, S., RAMISSE, V., CLERC, S., BERNILLON, D., LE GALL, F., JEANNIN, P., NESME, X., SIMONET, P. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 5409-5420
- FUENTES, I., MONTOYA, A., GARCIA-PEREZ, A.L., RAMIREZ, C., RODRIGUEZ, M. BARANDIKA, J.F., RUBIO, J.M. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from ovine in Spain: natural abortion versus asymptomatic adults. IX European Multicolloquium of Parasitology (Valencia, Spain, 2004).
- Gentilini M. « Médecine tropicale » Flammarion, 1993, 5^{ème} édition, 2^{ème} tirage actualisé en 1995 ; 10, 152-158
- Gilbert RE, Gras L, Wallon M, Peyron F, Ades AE, Dunn DT. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. *Int J Epidemiol.* 2001; 30:1303-8.
- GRIGG, M.E., GANATRA, J., BOOTHROYD, J.C., MARGOLIS, T.P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, 2001, 184, 633-639
- GUILLOT, B., DESMONTS, G. Diagnostic sérologique de la toxoplasmose – essai d'application aux animaux de boucherie. *Recueil de médecine vétérinaire de l'Ecole d'Alfort*, 1960, 136, 383-398
- HALL, S.M., PANDIT, A., GOLWILKAR, A., WILLIAMS, T.S. How do Jains get *Toxoplasma* infection ? *Lancet*, 1999, 354, 486-487.
- HALLIER-SOULIER, S., GUILLOT, E. Detection of cryptosporidia and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, 89, 5-10.
- HARRIS, J.R., PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *J. Parasitol.*, 1999, 85, 839-849
- HIMY-DAHAN, R., HEINRICH, A., FERRY, R., KEIN, T., KREMER, R. La toxoplasmose humaine et animale dans la région strasbourgeoise en 1980. Modifications observées depuis 1970. *Méd. Mal. Infect.*, 1983, 13, 457-459
- HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I : Epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.*, 2003, 136, 973-988.

- HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.*, 1995, 172, 1561-1566.
- HURTADO, A., ADURIZ, G., MORENO, B., BARANDIKA, J., GARCIA-PEREZ, A.L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet. Parasitol.*, 2001, 102, 17-27
- HUTCHISON, W.M. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1967, 61, 80-89
- HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., WORK, K., SIIM, J.C. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1971, 65, 380-399
- INOUE, M., RAI, S.K., ODA, T., KIMURA, K., NAKANISHI, M, HOTTA, H, UGA, S. A new filter-eluting solution that facilitates improved recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 55, 679-686
- ISAAC-RENTON, J., BOWIE, W.R., KING, A., IRWIN, G.S., ONG, C.S., FUNG, C.P., SHOKEIR, M.O., DUBEY, J.P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 2278-2280.
- ITO, S., TSUNODA, K., SHIMADA, K., TAKI, T., MATSUI, T. Disinfectant effects of several chemicals against *Toxoplasma* oocysts. *Nippon Juigaku Zasshi*, 1975, 37, 229-234
- JACKSON, M.H., HUTCHISON, W.M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. In: Baker, JR, & Muller, R (Eds). *Advances in Parasitology*. Academic Press, 1989, pp. 55-105
- JEWELL, M.L., FRENKEL, J.K., JOHNSON, K.M., REED, V., RUIZ, A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1972, 21, 512-517
- JOHNSON, D.W., PIENIAZEK, N.J., GRIFFIN, D.W., MISENER, L., ROSE, J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 3849-3855
- Jones J, Kruszon-Moran D, Wilson M, « *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000 », dans *Emerg Infect Dis*, vol. 9, n° 11, 2003, p. 1371-4
- JUNGERSEN, G., JENSEN, L., RASK, M.R., LIND, P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002, 25, 187-195
- KANETO, C.N., COSTA, A.J., PAULILLO, A.C., MORAES, F.R., MURAKAMI, T.O., MEIRELES, M.V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.*, 1997, 69, 203-210

- KASPER, L.H., WARE, P.L. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J. Clin. Invest.*, 1985, 75, 1570-1577
- KASPER, L.H., BRADLEY, M.S., PFEFFERKORN, E.R. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 1984, 132, 443-449.
- KAUCNER, C., STINEAR, T. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 1743-1749.
- KIKUCHI, Y., CHOMEL, B.B., KASTEN, R.W., MARTENSON, J.S., SWIFT, P.K., O'BRIEN, S.J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Vet. Parasitol.*, 2004, 120, 1-9
- KNIEL, K.E., LINDSAY, D.S., SUMNER, S.S., HACKNEY, C.R., PIERSON, M.D., DUBEY, J.P. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *J. Parasitol.*, 2002, 88, 790-793
- KOURENTI, C., HECKEROTH, A., TENTER, A., KARANIS, P. Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 102-106
- KOURENTI, C., KARANIS, P. Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Water Sci. Technol.*, 2004, 50, 287-291.
- KREADER, C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 1102-1106
- KUCZYNSKA, E., SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 2820-2826.
- KUHN, R.C., ROCK, C.M., OSHIMA, K.H. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 2066-2070
- KUTIČIČ, V., WIKERHAUSER, T. Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.*, 1996, 219, 261-265.
- LABELLE, P., DUBEY, J.P., MIKAELIAN, I., BLANCHETTE, N., LAFOND, R., ST-ONGE, Q., MARTINEAU, D. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in lynx (*Lynx Canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) from Québec, Canada. *J. Parasitol.*, 2001, 87, 1194-1195

- LADIGES WC, DiGiacomo RF, Yamaguchi RA. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and oocysts in pound-source cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1982;180:1334-5.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 277, 680-685
- LAPPIN MR, Greene CE, Prestword AK, Dawe DL, Tarleton RL. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. *Am J Vet Res.* 1989;50:1580-1585.
- LEGAY, J.M. Sur une tentative d'estimation du nombre total de chats domestiques. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1986, 17, 709-712
- LEHMANN T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. La mondialisation et la structure de la population de *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:11423-8.
- LEHMANN, T., BLACKSTON, C.R., PARMLEY, S.F., REMINGTON, J.S., DUBEY, J.P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J. Parasitol.*, 2000, 86, 960-971
- LEHMANN, T., GRAHAM, D.H., DAHL, E.R., BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect. Genet. Evol.*, 2004, 4, 107-114.
- LEHMANN, T., GRAHAM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., LAUNER, F., CORN, J.L., GAMBLE, H.R., DUBEY, J.P. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect. Genet. Evol.*, 2003, 3, 135-141
- LERHER, S.S., FASMAN, G.D. Ultraviolet irradiation effects in poly-L-tyrosine and model compounds. Identification of bityrosine as a photoproduct. *Biochemistry*, 1967, 6, 757-767.
- LINDQUIST, H.D., BENNETT, J.W., HESTER, J.D., WARE, M.W., DUBEY, J.P., EVERSON, W.V. Autofluorescence of *Toxoplasma gondii* and related coccidian oocysts. *J. Parasitol.*, 2003, 89, 865-867
- LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., DUBEY, J.P. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet. Parasitol.*, 2002, 103, 309-313.
- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.C., FLICK, G.J., DUBEY, J.P. Effects of high pressure processing on infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for mice. Joint meeting American Association of Veterinary Parasitologists and American Society of Parasitologists. (Philadelphia, PA, July 2004a).
- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.V., MITCHELL, S.M., COLE, R.A., FLICK, G.J., WETCH, C.N., LINDQUIST, A., DUBEY, J.P. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2003, 50S, 687-688.

- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.V., MITCHELL, S.M., WETCH, C.N., ROSYPAL, A.C., FLICK, G.J., ZAJAC, A.M., LINDQUIST, A., DUBEY, J.P. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Parasitol.*, 2004b, 90, 1054-1057
- LINDSAY, D.S., PHELPS, K.K., SMITH, S.A., FLICK, G., SUMNER, S.S., DUBEY, J.P. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2001, Suppl,197S-198S.
- LINDSAY, D.S., SMITH, P.C., HOERR, F.J., BLAGBURN, B.L. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama. *J. Parasitol.*, 1993, 79, 870-873
- LINDSTROM Bontell, I., Hall, N., Ashelford, K. E., Dubey, J. P., Boyle, J. P., Lindh, J. and Smith, J. E. (2009) Whole genome sequencing of a natural recombinant *Toxoplasma gondii* strain reveals chromosome sorting and local allelic variants. *Genome Biol*, 10, R53.
- LINDSTROM , I., Sundar, N., Lindh, J., Kironde, F., Kabasa, J. D., Kwok, O. C., Dubey, J. P. and Smith, J. E. (2008) Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology*, 135, 39-45.
- LUKESOVA, D., LITERAK, I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.*, 1998, 74, 1-7
- MARSHALL, P.A., HUGHES, J.M., WILLIAMS, R.H., SMITH, J.E., MURPHY, R.G., HIDE, G. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. *Parasitology*, 2004, 128, 39-42
- MASALA, G., PORCU, R., MADAU, L., TANDA, A., IBBA, B., SATTA, G., TOLA, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.*, 2003, 117, 15-21.
- MATSUO, J., KIMURA, D., RAI, S.K., KUMA, S. Detection of *Toxoplasma* oocysts from soil by modified sucrose flotation and PCR methods. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 2004, 35, 270-274.
- McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, Wolters C, Stein L, Stein M, Schey W, et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clin Infect Dis*. 1994; 18:38-72.
- McColgan, C., BUXTON, D., BLEWETT, D.A. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. *Vet. Rec.*, 1988, 123, 467-470
- McCuin, R.M., CLANCY, J.L. Modifications to United States environmental protection agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 267-274

McCuin, R.M., BUKHARI, Z., SOBRINHO, J., CLANCY, J.L. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods*, 2001 45, 69-76.

McQuillan G, Kruszon-Moran D, Kottiri B, Curtin L, Lucas J, Kingston R, « Racial and ethnic differences in the seroprevalence of 6 infectious diseases in the United States: data from NHANES III, 1988-1994 », dans *Am J Public Health*, vol. 94, n° 11, 2004, p. 1952-8

MILLER, M.A., GARDNER, I.A., KREUDER, C., PARADIES, D.M., WORCESTER, K.R., JESSUP, D.A., DODD, E., HARRIS, M.D., AMES, J.A., PACKHAM, A.E., CONRAD, P.A. Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 997-1006.

MILLER, M.A., GRIGG, M.E., KREUDER, C., JAMES, E.R., MELLI, A.C., CROSBIE, P.R., BOOTHROYD, J.C., BROWNSTEIN, D., CONRAD, P.A. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 275-284.

MILLER, N.L., FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and in birds. *J. Parasitol.*, 1972, 58, 928-937.

MONDRAGON, R., HOWE, D.K., DUBEY, J.P., SIBLEY, L.D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol.*, 1998, 84, 639-641

MONIS, P.T., SAINT, C.P. Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium* in finished water. *Water Res.*, 2001, 35, 1641-1648

MONTOYA, A., MIRO, G., JIMENEZ, S., MATEO, M., FRISUELOS, C., RAMIREZ, C., FUENTES, I. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from stray, farm, and household cats in Spain. IX European Multicolloquium of Parasitology (Valencia, Spain, 2004)

MOWAN J.M., Mambely R., Selekou B., et Coumazi-Malo M.F. «La toxoplasmose à l'Institut Pasteur de Bangui, République Centrafricaine (1996-1998): données sérologiques», Manuscrit n°2036, "Parasitologie", Avril 1999, 1-3.

MUSIAL, C.E., ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R., GERBA, C.P. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 687-692

NABIAS R., Ngouamizokou A., Migot-Nabias F., Mbou-Montsimbi R.A. et Lansoud – Soukate J. «Enquête sérologique sur la toxoplasmose chez les consultantes du centre de PMI de Franceville (Gabon) », Manuscrit n°1908, « Santé Publique », Aout 1998, 1-3.

NDIAYE A., Ndir O, DIOP T. M., Diallo A.G., Diouf A., Ndiaye D. «Bilan des examens sérologiques de la toxoplasmose au laboratoire de parasitologie-Mycologie de l'hôpital Aristide A. Le Dantec. Etude effectuée sur 122 prélèvements» Thèse de doctorat d'état en pharmacie, Janvier 2004.

NDIAYE A., Toguebaye B.S., Sembene P. MB., FAYE NG., BA F-L. «Séroprévalence de la toxoplasmose chez la femme enceinte au Centre d'Analyses de Biologie Médicale du Centre Hospitalier Abass Ndao en 2010. Etude effectuée sur 231 prélèvements» Mémoire de Master en biologie animale spécialité parasitologie, Novembre 2010.

NISSAPATORN V, Noor Azmi MA, Cho SM, Fong MY, Init I, Rohela M, Khairul Anuar A, Quek KF, Latt HM. Toxoplasmosis: prevalence and risk factors. J Obstet Gynaecol. 2003;23:618-24.

ORLANDI, P.A., LAMPEL, K.A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. J. Clin. Microbiol., 2000, 38, 2271-2277.

ORTEGA, Y.R., GILMAN, R.H., STERLING, C.R. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. J. Parasitol., 1997, 80, 625-629

OWEN, M.R., TREES, A.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. J. Parasitol., 1999, 85, 382-384.

OWEN, M.R., TREES, A.J. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. Parasitology, 1998, 116, 299-304

PENA, H. F., S. M. GENNARI, J. P. DUBEY, and C. Su. 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int. J. Parasitol. 38:561-569.

PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREZ-PEREZ, V., ALVAREZ-GARCIA, G., COLLANTES-FERNANDEZ, E., ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. Vet. Parasitol., 2004, 121, 33-43

PESTRE, M., MANDOUL, R., NICOLAS, J. Le mouton, réservoir du virus de la toxoplasmose: recherches sur les possibilités de la transmission de l'agent pathogène. Bull. Soc. Path. Exot., 1962, 55, 789-797

PESTRE-ALEXANDRE, M., DARDE, M.L., BOUTEILLE, B., BEN NACEUR, S., DESNOYERS, P., NICOLAS, J.A. Etude sérologique de la toxoplasmose chez le chat. Bull. Soc. Fr. Parasitol., 1984, 2, 109-112

POLDERMAN AM, Blotkamp J and Verweij JJ. Ned Tijdschr Klin Chem « Diagnosis of Strongyloides infections» 1999; 24: 60-65.

QUINTERO-BETANCOURT, W., PEELE, E.R., ROSE, J.B. Cryptosporidium parvum and Cyclospora cayetanensis: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. J. Microbiol. Methods, 2002, 49, 209-224.

RIAHI, H. Hammondia hammondi: études comparatives avec Toxoplasma gondii. Thèse de doctorat. Université de Limoges, 1997, 127 pages.

RADKE, J.R., GUBBELS, M.J., JEROME, M.E., RADKE, J.B., STRIEPEN, B., WHITE, M.W. Identification of a sporozoite-specific member of the Toxoplasma SAG superfamily via genetic complementation. Mol. Microbiol., 2004, 52, 93-105

RAGOZO , A. M., Pena, H. F., Yai, L. E., Su, C. and Gennari, S. M. (2010) Genetic diversity among Toxoplasma gondii isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. Vet Parasitol, 170, 307-312.

RILEY, S.P.D., FOLEY, J., CHOMEL, B. Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. J. Wild. Dis., 2004, 40, 11-22

ROBERTSON, L.J., GJERDE, B., CAMPBELL, A.T. Isolation of Cyclospora oocysts from fruits and vegetables using lectin-coated paramagnetic beads. J. Food Protect., 2000, 63, 1410-1414

ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., STEWART, M.H., WOLFE, R.L. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia in water. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63, 106-114.

ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., JOHNSON, A., STEWART, M.H., WOLFE, R.L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious Cryptosporidium parvum oocysts from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65, 841-845.

ROGHMANN, M.C., FAULKNER, C.T., LEFKOWITZ, A., PATTON, S., ZIMMERMAN, J., MORRIS, J.G. Decreased seroprevalence for Toxoplasma gondii in Seventh Day Adventists in Maryland. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1999, 60, 790-792

Roizen N, Swisher CN, Stein MA, Hopkins J, Boyer KM, Holfels E, Mets MB, Stein L, Patel D, Meier P et coll. Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. Pediatrics. 1995; 95:11-20

RUIZ, A., FRENKEL, J.K., CERDAS, L. Isolation of Toxoplasma from soil. J. Parasitol., 1973, 59, 204-206

RYLEY, J.F. Cytochemistry, physiology, and biochemistry. In: Hammond, DM, & Long, PL (Eds). The Coccidia. University Park Press, 1973, Baltimore pp. 145-181.

- ŠAFARÍK, I., ŠAFARÍKOVÁ, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J. Chromatogr. B*, 1999, 722, 33-53.
- SCHWAB, K.J., McDevitt, J.J. Development of a PCR-enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Toxoplasma gondii* oocysts, incorporating PCR controls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 5819-5825
- SEDLAK, K., LITERAK, I., BARTOVA, E., DVORAKOVA, H., BARTA, J. Susceptibility of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) to experimental infection with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Avian Pathol.*, 2004, 33, 153-157
- SHEFFIELD, H.G., MELTON, M.L. Effects of pyrimethamine and sulfadiazine on the intestinal development of *Toxoplasma gondii* in cats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1976, 25, 379-383
- SHENEP, J.L., BARENKAMP, S.J., BRAMMEIER, S.A., GARDNER, T.D. An outbreak of toxoplasmosis on an Illinois farm. *Pediatr. Infect. Dis.*, 1984, 3, 518-522
- SHEPHERD, K.M., WYN-JONES, A.P. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 1317-1322.
- SHIELDS, J.M., OLSON, B.H. *Cyclospora cayentanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int. J. Parasitol.*, 2003, 33, 371-391
- SILVA, J.C.R., OGASSAWARA, S., ADANIA, C.H., FERREIRA, F., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., FERREIRA-NETO, J.S. Seroprevalence in captive neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2001, 102, 217-224
- SIMMONS III, O.D., SOBSEY, M.D., HEANEY, C.D., SCHAEFFER III, F.W., FRANCY, D.S. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 1123-1127.
- SKJERVE, E., WALDELAND, H., NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev. Vet. Med.*, 1998, 35, 219-227.
- SLUTER, S.D., TZIPORI, S., WIDMER, G. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 48, 325-330
- SMITH, D.D., FRENKEL, J.K. Cockroaches as vectors of *Sarcocystis muris* and other coccidia in the laboratory. *J. Parasitol.*, 1978, 64, 315-319
- SPEER, C.A., DUBEY, J.P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 2005, 35, 193-206

SPEER, C.A., CLARK, S., DUBEY, J.P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1998, 84, 505-512

STAGNO, S., DYKES, A.C., AMOS, C.S., HEAD, R.A., JURANEK, D.D., WALLS, K. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics*, 1980, 65, 706-711.

STURBAUM, G.D., ORTEGA, Y.R., GILMAN, R.H., STERLING, C.R., CABRERA, L., KLEIN, D.A. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 2284-2286.

SU, C., EVANS, D., COLE, R.H., KISSINGER, J.C., AJIOKA, J.W., SIBLEY, L.D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, 2003, 299, 414-416.

TAVERNE, J. Toxoplasmosis in Brazil (In brief). *Trends Parasitol.*, 2002, 18, 203-204.

TEMPLETON, T.J., LANCTO, C.A., VIGDOROVICH, V., LIU, C., LONDON, N.R., HADSALL, K.Z., ABRAHAMSEN, M.S. The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect. Immunity*, 2004, 72, 980-987

TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30, 1217-1258.

TEUTSCH, S.M., JURANEK, D.D., SULZER, A., DUBEY, J.P., SIKES, R.K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N. Engl. J. Med.*, 1979, 300, 695-699.

Thulliez P, Daffos F, Forestier F, Marcon Pernot P, Giovangrandi Y. Toxoplasmoses et rubéole congénitales: Diagnostic prénatal. *Rech Gynecol* 1990 ; 2 : 133-35.

TILLEY, M., FICHERA, M.E., JEROME, M.E., ROOS, D.S., WHITE, M.W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infect. Immunity*, 1997, 65, 4598-4605

USEPA. Method 1623: *Giardia* and *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA, 2001, 821-

Valcavi PP, Natali A, Soliani L, Montali S, Dettori G, Cheezi C. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in the population of the area of Parma (Italy). *Eur J Epidemiol.* 1995;11:333-7.

VARMA, M., HESTER, J.D., SCHAEFFER III, F.W., WARE, M.W., LINDQUIST, H.D.A. Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 53, 27-36.

VELMURUGAN GV, DUBEY JP, Su C. Études génotypage des souches de *Toxoplasma gondii* en provenance d'Afrique ont révélé que les lignées clonales archétypales prédominent comme en Amérique du Nord et en Europe. *Vet Parasitol* 2008; 155:314-8.

- VIEIRA DA SILVA, A., LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.*, 2001, 97, 191-198
- VILLENA, I. Risques environnementaux parasitaires d'origine hydrique et incidence de *Toxoplasma gondii*. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, 2004, 214 pages.
- VILLENA, I., AUBERT, D., GOMIS, P., FERTE, H., INGLARD, J.C., DENIS-BISIAUX, H., DONDON, J.M., PISANO, E., ORTIS, N., PINON, J.M. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocysts detection in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 4035-4039.
- WALLACE, G.D. Intermediate and transport hosts in the natural history of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1973, 22, 456-464
- WARD, L.A., WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.*, 2001, 41, 37-42
- WEIGEL, R.M., DUBEY, J.P., DYER, D., SIEGEL, A.M. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in Illinois. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999, 60, 793-798.
- WIEDENMANN, A., KRÜGER, P., BOTZENHART, K. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples – a review of published protocols and current developments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 21, 150-166.
- WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 3741-3751
- WOHLSSEN, T., BATES, J., GRAY, B., KATOULI, M. Evaluation of five membrane filtration methods for recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 2318-2322
- WYSS, R., SAGER, H., MULLER, N., INDERBITZIN, F., KONIG, M., AUDIGE, L., GOTTSTEIN, B. The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as regards meat hygiene. *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, 2000, 142, 95-108.
- YAKUB, G.P., STADTERMAN-KNAUER, K.L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 3628-3631
- YILMAZ, S.M., HOPKINS, S.H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.*, 1972, 58, 938-939
- ZARLENGA, D.S., TROUT, J.M. Concentrating, purifying, and detecting waterborne parasites. *Vet. Parasitol.*, 2004, 126, 195-217

ZARNKE, R.L., DUBEY, J.P., VER HOEF, J.M., McNAY, M.E., KWOK, O.C.H. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in lynx from interior Alaska. *J. Wild. Dis.*, 2001, 37, 36-38

ZHANG, S.Y., WEI, M.X., ZHOU, Z.Y., YU, J.Y., SHI, X.Q. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sera of rare wildlife and the Shanghai Zoological Garden, People's Republic of China. *Parasitol. Int.*, 2000, 49, 171-174

ZHAO, X., DUSZYNSKI, D.W., LOKER, E.S. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. *J. Microbiol. Methods*, 2001, 44, 131-137.

ZHOU, P., Zhang, H., Lin, R. Q., Zhang, D. L., Song, H. Q., Su, C. and Zhu, X. Q. (2009) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitol Int*, 58, 193-195.

ANNEXES

Annexe 1

Méthode de dosage (chez la femme) : Immunocombs

I-2.2.a-Principe

Le déroulement du test consiste à transférer le peigne d'un compartiment au compartiment suivant. La première étape consiste à distribuer les échantillons dans les puits individuels du bac de développement compartimenté (Pour les IgM, les échantillons subissent d'abord un prétraitement pour capter les IgG, puis une étape d'incubation avec le diluant du compartiment A pour absorber le facteur rhumatoïde). Puis la carte Immunocombs est introduite dans les puits A pour la réaction Antigène-Anticorps. Tout anticorps non fixé de façon spécifique lors de cette première étape est éliminé au cours d'une étape de lavage dans le compartiment B. Dans le compartiment C, les anticorps toxoplasmiques IgM ou IgG suivant le cas fixés sur les spots inférieurs des dents du peigne ainsi que les immunoglobulines humaines du spot supérieur (contrôle interne) sont reconnus par un anticorps anti- IgM ou anti -IgG humaines conjugué à la phosphatase alcaline (AP). Après deux nouvelles étapes de lavages dans les compartiments D et E, la phosphatase alcaline réagit dans le compartiment F avec un composé chromogénique. Cette dernière réaction entraîne la visualisation des résultats sous forme de spots gris-bleu à la surface des dents du peigne. La trousse comprend un control positif (anticorps IgM ou IgG anti-toxoplasme selon le cas) et un control négatif. Le test réalisé, la dent du contrôle positif doit afficher deux spots. La dent du contrôle négatif doit afficher le spot supérieur de contrôle interne, soit seul, soit éventuellement associé à un spot inférieur très faible. Enfin le spot supérieur de contrôle interne doit être visible sur chaque dent correspondant à un échantillon testé, confirmant ainsi le bon fonctionnement des réactifs ainsi qu'une manipulation correcte.

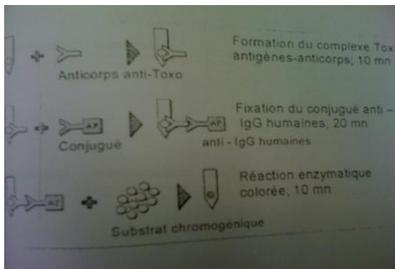


Figure 10 : Principe de la réaction IgG

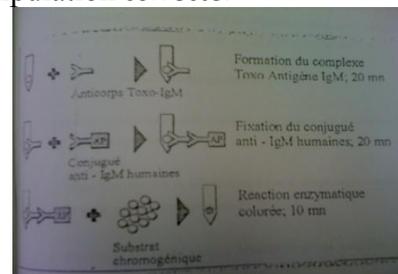


Figure 11 : Principe de la réaction IgM

I-2.2.b-Mode opératoire :

Le mode opératoire résumé ci-dessous est réservé aux utilisateurs de la trousse Immunocomb Toxo IgM ou IgG.

1-Equilibrer réactifs et échantillons à tester à la température ambiante et exécuter le test à la température ambiante.

2-Pré-diluer 10 µl de chaque échantillon et des contrôles dans 100 µl de diluant échantillons et incuber 10 minutes (IgM seulement).

3-Distribuer 25 µl de chaque échantillon pré-dilué pour IgM ou 10 µl de chaque échantillon pur pour IgG et des deux contrôles à quantité spécifique suivant le cas dans les puits du compartiment A et homogénéiser (incuber 10 minutes pour IgM).

4-Insérer le peigne dans le compartiment A et procéder comme indiqué dans le tableau

Tableau 16: Résumé du mode opératoire

Etape	Compartment	Opération
Réaction Antigène-Anticorps	A	Homogénéiser, incuber 20 minutes pour IgM (10 minutes pour IgG), absorber
Lavage	B	Agiter, incuber 2 minutes, absorber
Conjugué	C	Homogénéiser, incuber 20 minutes, absorber
Lavage	D	Agiter, incuber 2 minutes, absorber
Lavage	E	Agiter, incuber 2 minutes, absorber
Révélation	F	Homogénéiser, incuber 10 minutes
Réaction d'arrêt	E	Incuber 1 minute, sécher à l'air



a) Prétraitement



b) Incubation des bacs



c) Etape A



d) Etape B



e) Etape C



f) Etape D



g) Etape E



h) Etape F

Figure 12 : Illustration du mode opératoire

I-2-2..c- Lecture et interprétation

➤ Lecture : La lecture se fait de manière visuelle, qualitative pour IgM et quantitative pour IgG. Elle consiste à comparer l'intensité du spot inférieur de chaque dent avec l'intensité du spot inférieur de la dent du contrôle positif. Ainsi :

-un spot présentant une intensité supérieure ou égale à l'intensité du spot du contrôle positif indique la présence d'anticorps IgM ou IgG antitoxoplasmique dans l'échantillon testé.

-l'absence de spot ou un spot présentant une intensité inférieure à l'intensité du spot du contrôle positif indique l'absence d'un taux détectable d'anticorps IgM ou IgG antitoxoplasmique dans l'échantillon testé (résultat négatif) (figure 13).

Illustration :



Figure 13 : Matérialisation des spots sur les dents des peignes

La quantification se fait à l'aide du CombScals TM en calibrant le spot inférieur du contrôle positif sous la couleur correspondante dans l'échelle des couleurs en ajustant la règle de sorte que le '10' ou 'C+' apparaisse dans la fenêtre située au dessus de l'intensité de la couleur sélectionnée et enfin on lit les résultats des différents échantillons sans déplacer la position calibrée de la règle (figure 14).

Illustration



Figure 14: Calibration de la règle sur le CombScals en vue de la quantification

➤ Interprétation

Du fait que la présence d'anticorps IgM n'est pas persistante au delà de 1 an, ni observable en cas de réactivation, la détection qualitative des anticorps de type IgM fournit une confirmation rapide d'une infection aiguë ou récente seulement. La détection quantitative des anticorps IgG peut fournir une détermination du statut immunitaire chez la femme enceinte et le nouveau-né, du fait de la persistance des anti-Toxo-IgG tout au long de la vie. Au cas d'une augmentation du titre au-delà de quatre fois le niveau précédent, on peut diagnostiquer une infection active. Chez l'enfant, la détection en série des anti-Toxo-IgG peut discriminer l'infection entre son origine congénitale (niveau constant) ou néonatale (accroissement progressif du titre). (Desmonts, 1982 ; Frenkel, 1973 ; Luf, 1983 ; Vercruysse, 1982).

Nb : Chez le chien et le chat, on a utilisé le test d'agglutination direct sur plaque qui consiste à mélanger une goutte de sérum avec une goutte de Pastorex Toxo-latex BIO-RAD dont la positivité est matérialisée par une agglutination visible à l'œil nu au bout de 2 minutes d'agitation rotative. Le seuil de positivité à 6 UI/ml.

Annexe2

1-Données du CRB sur la toxoplasmose congénitale

Le Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma a été créé sous l'égide du ministère de la Recherche visant à collecter, caractériser et conserver des isolats de *Toxoplasma gondii* documentés sur le plan biologique et clinique. Il est sous la responsabilité du Pr Pinon (laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Reims) et co-géré par les laboratoires de Parasitologie et de Mycologie de Reims (responsable : Pr I. Villena) et de Limoges (responsable, Pr Dardé). Ce CRB s'appuie sur un réseau national de laboratoires de Parasitologie et de Mycologie permettant de collecter des isolats dans tout l'hexagone : M. Pinon, I. Villena, (Reims, RMS), M.L. Dardé, D. Ajzenberg (Limoges, LGE) P. Thulliez (Paris Institut de Puériculture, IPP), P. Marty (Nice, LPN), M.H. Bessieres (Toulouse, TOU), J.P. Gangneux (Rennes, REN), L. Paris (Paris Pitié-Salpêtrière, PSP), J. Berthonneau (Poitiers, PTR), A. Bonnin (Dijon, DIJ), E. Candolfi (Strasbourg), D. Chabasse (Angers), B. Couprie (Bordeaux, BDX), L. Delhaes (Lille, LIL), C. Duhamel (Caen, CAE), T.H. Duong (Tours, TRS), L. Favennec (Rouen), P. Flori (Saint Etienne), B. Fortier (Nancy, NCY), J. Franck (Marseille, MAR), J.F. Garin (Paris Saint Louis), O. Morin (Nantes, NAN), G. Nevez (Amiens), H. Pelloux (Grenoble, GRE), F. Peyron (Lyon, CRL), R. Piarroux (Besançon), F. Pratlong, P. Bastien (Montpellier, MTP), D. Quinio (Brest), H. Yera (Paris Cochin, CCH). À ce réseau initial, s'est joint le centre hospitalier de Cayenne (M. Demar, B. Carme) et celui de Saint Laurent du Maroni (Dr Penaud). Les isolats humains sont dénommés par le code du laboratoire, l'année d'isolement et les trois premières lettres du patient. Les isolats animaux ont un code commençant par le pays d'isolement, puis l'année d'isolement et les 3 premières lettres du genre et de l'espèce animale. La collecte des isolats a été effectuée entre 2002 et 2005.

Dans le CRB, ont été également intégrés quelques isolats « historiques », des isolats provenant de l'étranger suite à des collaborations avec diverses équipes (A. Puime, Instituto de Higiene de Montevideo, Uruguay ; A. Freire, Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay ; J. Gomez, Université de Quindio, Colombie ; N. Ziaali, Université des Sciences Médicales de Téhéran, Iran ; A. Vilares, Institut Ricardo Jorge, Lisbonne, Portugal ; S. de Sousa, Institut Abel Salazar, Porto, Portugal ; S. De Craeye, Institut Pasteur de Bruxelles, Belgique) et des isolats collectés entre 1993 et 2001 dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) entre Reims, Toulouse, Grenoble et Limoges. Au total, ils avons pu réaliser un typage multilocus à l'aide de marqueurs microsatellites de 542 isolats, qui correspondent à 510 cas de toxoplasmose. Ces 510 cas se répartissent de la façon suivante : 277 proviennent de toxoplasmoses humaines congénitales, 40 de toxoplasmoses humaines acquises chez l'immunodéprimé, 21 de toxoplasmoses humaines acquises chez l'immunocompétent et 172 de toxoplasmoses animales. Pour pouvoir faciliter le typage génétique de ce grand nombre d'isolats, ils ont mis au point une technique multiplex permettant, en une seule PCR, un typage multilocus

simple, rapide, reproductible et adapté aux larges séries d'isolats de *T. gondii* (Ajzenberg et al., 2005b).

2-Technique multiplex

Nous avons sélectionné pour leur technique multiplex cinq marqueurs microsatellites (TUB2, W35, TgM-A, B18, et B17). Nous avons précédemment montré (Ajzenberg et al., 2004) que leur polymorphisme modéré permettait de regrouper les souches archétypales dans les 3 principales lignées clonales, mais également d'identifier les génotypes recombinants ou atypiques. Cette technique multiplex n'est cependant qu'une technique de dépistage car elle ne met en évidence que le polymorphisme de longueur de ces cinq microsatellites grâce au logiciel GeneScan après électrophorèse des produits de PCR sur séquenceur automatique. Ce polymorphisme est suffisant pour faire le « tri » entre isolats de types I, II et III et génotypes recombinants ou atypiques. En revanche, si un génotype recombinant ou atypique est identifié, le séquençage de chaque marqueur est nécessaire afin de mieux préciser la séquence des microsatellites. Nous disposons également de cinq autres marqueurs hautement polymorphes (N60608, N82375, N83021, N61191 et AA519150) qui permettent, grâce à leur fort pouvoir de discrimination (Ajzenberg et al., 2002a) de différencier des toxoplasmes de même type clonal. Nous réservons l'utilisation de ce type de marqueurs aux études de « fingerprinting » permettant par exemple d'identifier une souche responsable d'une épidémie (Ajzenberg et al., 2005a) ou d'écarter une contamination avec la souche RH lorsqu'une souche de type I est isolée (Ajzenberg et al., 2002b ; Gallego et al., 2004).

L'intérêt de la technique multiplex est de pouvoir détecter les génotypes recombinants ou atypiques par typage multilocus en une seule PCR. Ces génotypes, rares dans une population largement clonale comme en France, mais très fréquents dans d'autres régions géographiques comme en Amérique latine et certainement en Afrique, ne peuvent pas être détectés par un typage monolocus. L'affiliation à un type I, II ou III des isolats typés par PCR-RFLP sur SAG2 n'a donc aucune valeur, en particulier pour les nombreux isolats d'Amérique du Sud. Seul un typage multilocus pourrait caractériser correctement ces isolats. Récemment, une autre technique multiplex a été décrite (Khan et al., 2005a) qui consiste dans un premier temps à amplifier par PCR multiplex 4 marqueurs (5'SAG2, 3'SAG2, SAG3, TUB2 et GRA6). Dans un second temps, cinq PCR nichées (nested-PCR) sont effectuées séparément sur le produit de PCR amplifié. Puis, par un jeu de 6 enzymes de restriction différentes, il est possible de détecter au maximum 3 allèles par marqueur. Cette technique, par rapport à la nôtre, présente des avantages et des inconvénients.

Selon eux, la principale limite de cette technique est le choix du polymorphisme par PCR-RFLP qui est beaucoup trop limité (3 allèles par marqueur). Ce faible polymorphisme ne permet pas de différencier les génotypes recombinants des génotypes atypiques. Un séquençage de l'intron du gène UPRT a été nécessaire pour classer la souche WU05 en atypique (Khan et al., 2005a). Même si le

séquençage nous permet d'affiner le génotype des isolats atypiques, notre technique multiplex a le plus souvent dépisté ces génotypes grâce au polymorphisme plus important de nos marqueurs (jusqu'à 16 allèles pour le marqueur B17). Il est vrai, cependant, que la distinction entre recombinants et atypiques nous est parfois difficile et nécessite des marqueurs supplémentaires, comme GRA6 ou GRA7. L'autre inconvénient de la technique multiplex de Khan et al. (2005a) est sa relative lourdeur au niveau technique. Notre technique ne nécessite qu'une seule PCR par isolat, alors qu'il en faut 6 dans celle de Khan et al. (2005a). Ceci est dû au principe de la nested-PCR qui nécessite 2 PCR consécutives. Dans Khan et al. (2005a), la technique multiplex n'est en fait réalisée que sur la première PCR, la deuxième PCR doit être faite séparément pour chaque marqueur. De plus, l'action séparée des enzymes de restriction est une étape supplémentaire. Nous pensons que cette technique est moins bien adaptée aux larges séries que la nôtre.

Evidemment, notre technique nécessite un séquenceur automatique qui n'est pas disponible dans tous les laboratoires.

L'intérêt de la technique multiplex de Khan et al. (2005a) est sa très forte sensibilité permettant un typage complet avec seulement 5 -10 parasites dans le prélèvement. Ceci a permis aux auteurs de réaliser un typage directement à partir du prélèvement ou typage direct (i.e. sans inoculation aux souris ou aux cultures cellulaires préalable du prélèvement), même si le typage complet avec les 4 marqueurs n'a été possible que dans deux cas. Cette grande sensibilité est due au choix de la nested-PCR. Nous avons toujours refusé de mettre au point une technique nested-PCR pour augmenter la sensibilité de notre PCR multiplex. En effet, en amplifiant un produit PCR déjà amplifié, la nested-PCR est à très haut risque de contamination. D'après certains, cette technique devrait d'ailleurs être interdite dans le diagnostic par PCR en Médecine humaine. Pour augmenter la sensibilité de notre PCR multiplex, dans le cas de typages directs, nous avons légèrement modifié le programme de PCR en diminuant la température d'hybridation de 63°C à 61°C et en augmentant le nombre de cycles de 35 à 40. Avec ce nouveau protocole, nous avons estimé la sensibilité de notre technique multiplex entre 50 et 100 parasites par prélèvement, soit 10 fois moins sensible que celle de Khan et al. (2005a). Sur les 45 prélèvements divers sur lesquels nous avons tenté un typage direct avec notre technique multiplex, 32 ont cependant pu être typés de façon satisfaisante (au minimum 3 marqueurs sur 5).

Un autre intérêt du typage direct est de pouvoir détecter d'éventuelles infections mixtes. La détection de génotypes différents dans un même prélèvement a cependant des limitations techniques liées à l'extraction d'ADN, à la PCR et aux marqueurs utilisés. En cas d'infection mixte, on peut n'extraire que l'ADN d'un seul génotype si la quantité de tissu extraite est insuffisante du fait de la dispersion des parasites dans les tissus. Si les deux ADN différents sont extraits, au delà d'un ratio de 1 pour 100, seul l'ADN le plus abondant sera amplifié par PCR du fait de la compétition des amorces. Dans la plupart des études, les marqueurs (le plus

souvent un seul marqueur SAG2) ou la technique de typage (PCR-RFLP principalement) ne peuvent détecter que les infections mixtes impliquant des isolats de type différent (e.g. I + II ou I + III), contrairement aux microsatellites hautement polymorphes capables de différencier 2 isolats de même type.

Les infections mixtes sont considérées comme très rares. Nous avons décrit le premier cas d'infection mixte toxoplasmique (Ajzenberg et al., 2002a) chez un mouton grâce aux marqueurs microsatellites hautement polymorphes ayant permis de distinguer 2 isolats de type II chez le même animal. Parmi les 283 isolats collectés à partir de poulets, porcs, chiens ou chats en Amérique latine, seulement 3 avaient une infection mixte I + III (Dubey et al., 2003c ; Dubey et al., 2005a ; Pena et al., sous presse). Chez l'homme, mis à part l'étude d'Aspinall et al. (2003), une seule étude décrit une infection mixte I + II par typage direct sur liquide amniotique (Villena et al., 2004). Par sérotypage, Kong et al. (2003) rapportent un seul sérum réagissant à la fois avec les peptides spécifiques du type II et les peptides spécifiques des types I et III, mais une souche recombinante pourrait aussi donner un tel profil. Enfin, parmi les 542 isolats que nous avons typés avec nos marqueurs microsatellites, nous n'avons mis en évidence que deux infections mixtes : une chez le mouton déjà citée (Ajzenberg et al., 2002a) et une dans le cerveau d'une souris inoculée à partir d'un liquide amniotique dans le cadre d'une toxoplasmose congénitale humaine (LPN-2002-GIO).

L'étude d'Aspinall et al. (2003) retrouve une proportion importante d'infections mixtes dans les toxoplasmoses humaines qu'elles soient congénitales (31,5 % d'infections mixtes I + II sur 19 isolats), acquises chez l'immunodéprimé (2 infections mixtes I + II sur 8 isolats) ou chez l'immunocompétent (1 infection mixte I + II sur 2 isolats). Ces résultats trouveraient leur explication dans la forte proportion d'infections mixtes dans les préparations à base de viande de porc, d'agneau ou de bœuf (saucisses, pâté, etc.) destinés à la consommation humaine avec 22 % d'infections mixtes I + II sur 27 échantillons de viande positifs en PCR (Aspinall et al., 2002). Ces résultats se basent sur la même technique de typage par nested-PCR-RFLP du gène SAG2 directement à partir du prélèvement (typage direct). La singularité des résultats d'Aspinall et al. (2003) par rapport au reste de la littérature, notamment par rapport aux données du typage en France où le type II est largement majoritaire sans aucune infection mixte, a fait l'objet d'un débat (Villena et al., 2004 ; Aspinall et al., 2004). Le principal argument d'Aspinall et al. est que la plupart des typages ont été réalisés après isolement des toxoplasmes par inoculation aux souris ou culture cellulaire, ce qui constitue un biais par rapport au typage direct. La multiplication en culture cellulaire ou le passage en souris peut en effet sélectionner une seule souche si le prélèvement en contient plusieurs. La plus grande fréquence de type II en France ne peut être expliquée par ce biais. Il est généralement admis que si un prélèvement contient un mélange I + II ou I + III, c'est le type I qui sera sélectionné chez la souris ou en culture cellulaire du fait de la virulence plus importante et du taux de multiplication plus rapide du type I (Villena et al., 2004). Ceci est

confirmé dans l'étude d'Aspinall et al. (2003) où tous les échantillons avec infection mixte I + II inoculés parallèlement à la souris ont entraîné des signes de virulence 3-4 jours p.i. Le débat (Villena et al., 2004 ; Aspinall et al., 2004) a eu le mérite de terminer sur un consensus : l'isolement des toxoplasmes par culture cellulaire ou inoculation aux souris doit être couplée au typage direct quand il est possible. Néanmoins, il n'est pas du tout évident qu'un typage direct systématique puisse confirmer les taux très élevés d'infection mixtes rapportés par Aspinall et al. (2002, 2003). Ainsi, sur 224 prélèvements ayant été typés de façon directe et complète dans la littérature (Owen et Trees, 1999 ; Costa et al., 1997 ; Fuentes et al., 2001 ; Grigg et al., 2001c ; Villena et al., 2004 ; da Silva et al., 2005 ; Khan et al., 2005a ; Vallochi et al., 2005 ; Gallego et al., sous presse ; Pena et al., sous presse), on ne retrouve que 2 infections mixtes (Villena et al., 2004 ; Pena et al., sous presse), soit 0,9 %. Sur les 32 prélèvements typés directement par notre technique multiplex (Ajzenberg et al., 2005b), nous n'avons retrouvé aucune infection mixte. En réalité, selon nous, le fait de typer directement ou pas le prélèvement est une question vraiment mineure en comparaison avec les deux principaux biais qui ont appauvri la valeur du typage des isolats de *T. gondii* dans les toxoplasmoses humaines :

- Il est impossible de connaître le génotype d'un isolat par typage monolocus, qui plus est avec une technique de PCR-RFLP qui apporte une information génétique des plus rudimentaires (2 allèles maximum par site de restriction). Le problème est encore plus patent pour les isolats provenant d'Amérique latine, d'Afrique et certainement d'Asie, où on l'a vu, la diversité génotypique est bien plus importante. Si, en plus, la PCR réalisée est nichée (nested-PCR), la qualité du résultat doit être remise en doute au vu du très haut risque de contamination.
- Il est peu utile de réaliser un typage d'isolats d'origine humaine si l'on ne dispose pas d'informations cliniques minimales pour essayer de corréliser le résultat du typage avec les formes cliniques observées. La majorité des études de typage dans le monde ayant été réalisées avec un typage monolocus par n-SAG2 PCR-RFLP, sans renseignements cliniques la plupart du temps dans les toxoplasmoses humaines, il nous est très difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Essayer de trouver une influence du génotype dans les formes cliniques de toxoplasmose humaine ne pourra se faire qu'en cumulant le maximum de données du monde entier, mais en suivant une méthodologie identique : typage multilocus et données cliniques. Le but du CRB *Toxoplasma* est de répondre à ces objectifs.

Annexe 3

Recherche des kystes tissulaires de toxoplasme par digestion pepsique selon Dubey (1998c).

- pour 50 g de tissus musculaires ou de cerveau
- éliminer les tissus adipeux et conjonctifs et les gros vaisseaux
- couper en morceaux de 1 cm et broyer dans un blender
 - 15 s à faible vitesse
 - 30 s à vitesse maximum après ajout de 125 ml de NaCl 0,9%
- rincer le blender avec 125 ml supplémentaires
- préchauffer séparément à 37°C le broyat (250 ml) et la solution pepsique (250 ml)

contenant :

Pepsine (activité biologique 1:10 000 Sigma P7000)	1,3 g
NaCl	2,5 g
HCl concentré	3,5 ml
ED	qsp 250 ml

- mélanger volume/volume le broyat et la solution pepsique – incuber au bain-marie sous agitation pendant 1h à 37°C
- filtrer sur gaze et laver trois fois en NaCl 0,9% (1200 g, 10 min)
- reprendre le culot dans quelques millilitres de NaCl 0,9% contenant 40 mg de gentamycine/L
- inoculer par voie i.p. 0,5-1ml / souris.

Annexe 4

Tampons pour l'extraction de l'ADN des sporocystes de toxoplasme

1. Tampon SDS-EDTA-protéinase K

EDTA (660 mM)	6,14 g
SDS	0,25 g (1%)
Protéinase K à 20 mg/ml (Qiagen)	2,5 ml
ED	qsp 25 ml

Ajuster à pH 9,5

2. Tampon CTAB

Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Sigma H6269)	0,5 g (2%)
NaCl (1,4 M)	2,05 g
EDTA (20 mM)	0,19 g
Tris (100 mM)	0,30 g
2-ME	50 µl
ED	qsp 25 ml

Annexe 5

Séquence du gène AF146527 (Homan et al., 2000), amorces et sondes utilisées

1 ctgcaggag gaagacgaaa gttgtttttt tattttttt tctttttgtt tttctgattt
 61 ttgtttttt tgactcgggc ccagctgcgt ctgtcgggat gagaccgagg agccgaagtg
 121 cgttttctt tttgacttt tttttgttt ttacaggca agctgcctg tgcttgagc
 181 cacagaaggg acagaagtgc aaggggacta cagacgcgat gccgctcctc cagccgtctt
 241 ggaggagaga tatcaggact gtagatgaag **gagagggtga ggatgagggg** gtggcgtggt

Amorce TOX-SE →

301 **tggaagcga cgagagtcgg agaggagaa gatgtttccg gcttggtgc** ttttctgga

← Sonde TOX-LCR ← Sonde TOX-FLU

361 ggttgaaaa agagacaccg gaatg**cgatc cagacgagac gacg**tttcc tcgtggtgat

← Amorce TOX-AS

421 ggcggagaga attgaagagt ggagaagagg gcgagggaga cagatcgga ggcttgagc

481 aagggaggag gagggtagg agaggaatcc agatgcactg tgtctgcag

Composition d'un mix

	Volume (µl)	Concentration finale
H ₂ O ^a	6,7	
MgCl ₂ ^a	3,2	5 mM
Mix Taq ^a	2	
TOX-LCR (Tib Molbiol, Berlin, Allemagne)	0,5	0,5 µM
TOX-FLU (Tib Molbiol, Berlin, Allemagne)	0,1	0,1 µM
Amorces TOX-AS/SE (Proligo France)	1	0,5 µM/amorce
UNG (1U/µl) (Roche Diagnostics)	0,5	0,5 U
Extrait d'ADN	5	
Volume total	20	

^a Kit Light Cycler Faststart DNA Master Hybridization Probe (Roche Diagnostics)

Annexe 6

Marqueurs génétiques utilisés pour le typage des isolats de toxoplasme (selon Ajzenberg et al., 2004).

Marqueurs (chromosome)	N° d'accèsion ^a	Fonction codante ^b	Séquences des primers ^c
TUB2 (IX)	M20025, AY572562 → AY572604	Gène de la β - tubuline	(F) 5' 6FAM-GTCCGGGTGTTCTACAAAA 3' (R) 5' TTGGCCAAAGACGAAGTTGT 3'
W35 (II)	W35487, AY572605 → AY572647	Inconnue (EST)	(F) 5' GGTTCACTGGATCTTCTCCAA 3' (R) 5' 6FAM-AATGAACGTCGCTTGTTTCC 3'
TgM-A (X)	Y17507, AY572649 → AY572691	Gène de la myosine A	(F) 5' GGCGTCGACATGAGTTTCTC 3' (R) 5' HEX-TGGGCATGTAAATGTAGAGATG 3'
B18 (VII)	BM189462, AY572693 → AY572735	Inconnue (EST)	(F) 5' 6FAM-TGGTCTTCACCCTTTCATCC 3' (R) 5' AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA 3'
B17(XII)	BM175053, AY572737 → AY572779	Inconnue (EST)	(F) 5' CGACAAGTCCATGCGAACTA 3' (R) 5' HEX-GGCAACAGGAGGTAGAGGAG 3'

^a Numéro d'accèsion GenBank

^b EST, Expressed Sequence Tags.

^c F, forward primer; R, reverse primer

Annexe 7

Polymorphisme de longueur allélique pour cinq microsatellites considérés.

Les toxoplasmes isolés au cours de ce travail sont de type I/III et I/II/III,

comme l'isolat de référence PSP-2003-KOM

Isolats de reference	Type	Polymorphisme de longueur allélique (pb)				
		TUB2 [allele]	W35 [allele]	TgM-A [allele]	B18 [allele]	B17 [allele]
BK	I	291 [1]	248 [1.6]	204 [1]	158 [1.3]	340 [1]
Me49	II	289 [2.3]	242 [2.3.7]	202 [2]	156 [2]	334 [2.3]
NED	III	289 [2.3]	242 [2.3.7]	200 [3]	158 [1.3]	334 [2.3]
BOU	II*	289 [2.3]	244 [5]	202 [2]	156 [2]	334 [2.3]
RMS-2001-MAU	II/I* or II/III*	289 [2.3]	242 [2.3.7]	206 [5]	158 [1.3]	334 [2.3]
PSP-2003-KOM	I/III*	291 [1]	248 [1.6]	200 [3]	158 [1.3]	340 [1]
GUY-2002-KOE	Atypique	291 [1]	242 [2.3.7]	198 [4]	158 [1.3]	337 [11]

Annexe 8

Méthodes d'analyses statistiques des résultats

Les calculs de prévalence et de l'intervalle de confiance ont été effectués au moyen de Microsoft Excel selon les formules suivantes:

$$P = \frac{n}{N} * 100$$

avec n= nombre de prélèvements positifs et

N= nombre total des prélèvements examinés

P = Prévalence

L'intervalle de confiance (IC) au risque 5p.100 est:

$$IC = P \pm 1,96 \sqrt{P(1-P)/N}$$

P= prévalence observée dans l'échantillon et N= nombre total des prélèvements examinés

Les tests ont été effectués avec un intervalle de confiance de 95%

RESUME

RESUME

La toxoplasmose est une anthroponose d'importance médicale et vétérinaire, due au protozoaire *Toxoplasma gondii*. Les oocystes, émis par les félins, ont un rôle central dans la transmission du parasite en contaminant les animaux d'élevage, les végétaux et l'eau consommés par l'homme. Au cours de ce travail, nous avons essayé de restituer le bilan des examens sérologiques de la toxoplasmose effectués au laboratoire du Centre Hospitalier Abass NDAO (CHAN) chez la femme (179 cas) utilisant comme méthode le test immunoenzymatique en phase solide (EIA) et chez le chat (50 cas) et le chien (20 cas) utilisant comme méthode le test d'agglutination direct sur plaque. Il révèle une séroprévalence de $25 \pm 18,98\%$ chez le chien, de $70 \pm 12,70\%$ chez le chat et de $45,81 \pm 7,30\%$ chez la femme avec $44,24 \pm 7,58\%$ chez celle enceinte. L'efficacité du traitement actuel a été démontrée par retour à un taux faible en anticorps de type IgG à 10 UI/ml chez celles ayant reçu de la Rovamycine 3 millions UI à une dose de 1cp x 2/ jour pendant un mois. Le typage des souches d'analyse de génotypage effectué sur 10 isolats en utilisant le polymorphisme de la longueur de 15 marqueurs microsatellites dans un essai multiplex modifié a montré que les Génotypes Africa 1 ou type I/III (90 %) et Africa 2 ou type I/II/III (10%) circulent à Dakar au Sénégal. Ces résultats préliminaires devront être poursuivis par des études épidémiologiques et génétiques plus extensives.

Identification des souches de *Toxoplasma gondii* isolées à Dakar et étude de l'efficacité de la Spiramycine dans le traitement de la toxoplasmose

SUMMARY

Toxoplasmosis is an anthroponosis of medical and veterinary importance, due to the protozoan *Toxoplasma gondii*. Oocysts shed by felids play a key role in parasite transmission as they contaminate meat-producing animals, vegetables and water consumed later by humans. In this work, we tried to reproduce the results of serological tests for toxoplasmosis performed in the laboratory of the Abass NDAO hospital's in women (179 cases) as a method using the enzyme immunoassay solid phase (EIA) and cats (50 cases) and dogs (20 cases) as a method using the agglutination test Live plate. He shows a seroprevalence of $25 \pm 18,98\%$ in dogs, $70 \pm 12, 70\%$ in cats and $45.81 \pm 7,30\%$ in women with $44.24 \pm 7,58\%$ in pregnant women. The effectiveness of current treatment has been demonstrated by low return rate IgG antibodies to 10 IU / ml in those who received 3 million IU Rovamycine at a dose of 2 tablets for day to one month. Typing of strains genotyping analysis carried out on 10 isolates using the length polymorphism of 15 microsatellite markers in a modified multiplex assay showed that Africa 1 or type I / III (90%) and Africa 2 or Type I / II / III (10%) genotype circulating at Dakar in Senegal. These first results need to be followed by more extensive investigations.

Discipline: Génétique des Populations

Mots-clés : Génotype, Séroprévalence, Traitement, Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*.

Keywords: Genotype, prevalence, treatment, toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*.
