



HAL
open science

Conséquences des invasions de rongeurs liées aux activités humaines sur l'épidémiologie et la structure des populations de *Toxoplasma gondii* : l'exemple du Sénégal

Lokman Galal

► To cite this version:

Lokman Galal. Conséquences des invasions de rongeurs liées aux activités humaines sur l'épidémiologie et la structure des populations de *Toxoplasma gondii* : l'exemple du Sénégal. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0036 . tel-02314615

HAL Id: tel-02314615

<https://theses.hal.science/tel-02314615v1>

Submitted on 13 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges

École Doctorale 615 Sciences Biologiques et Santé

UNITE DE RECHERCHE UMR INSERM 1094 Neuroépidémiologie tropicale (NET)

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Parasitologie

Présentée et soutenue par
Lokman Galal

Le 12 octobre 2018

**Conséquences des invasions de rongeurs liées aux activités
humaines sur l'épidémiologie et la structure des populations
de *Toxoplasma gondii* : l'exemple du Sénégal**

Thèse dirigée par Dr Aurélien Mercier et Dr Daniel Ajzenberg

JURY :

Rapporteurs

Mme. Karen McCoy, Directeur de recherche, UMR MIVEGEC, Université de Montpellier
Mme. Pikka Jokelainen, Professeur associé, Département de biosciences vétérinaires,
Faculté de médecine vétérinaire, Université d'Helsinki (Finlande)

Examineurs

Mme. Marie-Lazarine Poulle, Ingénieur de recherche, EA7510 ESCAPE, Université de
Reims Champagne-Ardennes
Mme. Marie-Laure Dardé, Professeur, UMR Inserm 1094 NET, Université de Limoges
M. Aurélien Mercier, Maître de conférences, UMR Inserm 1094 NET, Université de Limoges
M. Daniel Ajzenberg, Maître de conférences, UMR Inserm 1094 NET, Université de Limoges

Remerciements

Je rends grâce à Dieu pour toutes ses faveurs et ses bienfaits à mon égard.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse.

En tout premier lieu Aurélien Mercier pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé durant ces trois années et pour tous les efforts qu'il a fait pour que tout se déroule dans les meilleures conditions. Je le remercie pour tout le temps qu'il a pris et tout le dévouement qu'il a mis pour me transmettre son savoir et son expérience.

Daniel Ajzenberg pour la confiance qu'il m'a accordée, pour son implication et son sens de la rigueur qui m'a beaucoup inspiré.

Philippe Vignoles pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail et pour les séances de travail agréables et constructives effectuées dans son bureau.

Marie-Laure Dardé pour son accueil bienveillant, son implication précieuse, sa guidance et ses conseils mais également pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Homayoun Riahi pour le temps qu'il m'a donné et pour ses nombreux conseils très utiles.

Martin Gatet et Nicolas Plault pour leur aimable aide et leur disponibilité.

Farid Boumediene pour son aide bienveillante, sa disponibilité et pour sa générosité à prodiguer ses connaissances.

Le Professeur Pierre-Marie Preux pour son accueil au sein de l'UMR Inserm (et IRD ?) 1094.

Mes rapporteurs le Dr Karen McCoy and le Dr Pikka Jokelainen pour avoir accepté de juger ce travail.

Le Dr Marie-Lazarine Poulle d'avoir accepté de juger ce travail en tant d'examineur.

Bien sûr à mes collègues doctorants de l'équipe pour la compagnie agréable que j'ai pu partager avec eux. D'abord mes collègues de bureau Julien, Clotilde et Azra, et aussi tous les autres : Mayoura, Emilie, Salmane, Geoffrey, Jaime, Gilles. Je n'oublie pas aussi les anciens : Patcharee, Paula, Emilie.

Une pensée aussi aux nombreux stagiaires avec qui j'ai pu travailler durant ma thèse : bien sûr Thomas et Amedine pour leur contribution indispensable à ce travail, mais aussi Thao, Camille, Elodie, Océane et Clément.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir sans l'excellente collaboration que nous avons eu avec l'équipe du CBGP, aussi bien en France qu'au Sénégal. Un très grand merci à Carine Brouat pour son implication, sa disponibilité et sa contribution très précieuse à ce travail. Je remercie aussi Laurent Granjon, Jean-Marc Duplantier mais aussi Ambroise Dalecky pour leur excellent accueil et leur aide dans ce travail.

Mes compagnons de terrains et guides bienveillants Mamoudou Diallo et Aliou Sow. Je n'oublierais pas votre accueil chaleureux dans votre pays et au sein de vos familles.

Diarama !

Khalilou Ba pour son accueil à Mbarigo durant nos missions de terrain. Mes remerciements vont aussi à Monsieur Ibrahima Gueye pour son accueil au sein du parc du Djoudj et pour les discussions très intéressantes qu'on a pu avoir, sans oublier le Dr Bayal.

Mamadou Kane pour son accueil à BIOPASS, ainsi qu'à Nathalie Sarr pour son aide et sa

gentillesse. Une pensée également pour Claire Stragier, beaucoup de bons souvenirs.
Un grand merci à Moustapha Bendia pour son aide indispensable sur le terrain.
Le professeur Moustapha Diagne pour son accueil à la faculté des sciences de l'UCAD.
Egalement Madame Mbengue pour son aide et sa gentillesse.

Enfin, ma famille, mes parents, Zineb, Hagar et Mostafa. C'est à travers vous que je trouve soutien et force. Je ne saurais vous exprimer ma gratitude par de simples mots.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Chapitre I. Généralités sur <i>Toxoplasma gondii</i> et objectifs de la thèse	12
I.1. Historique de la découverte de <i>Toxoplasma gondii</i>	12
I.2. Cycle de transmission et modes d'infection	12
I.3. La toxoplasmose humaine	14
I.4. La diversité génétique de <i>Toxoplasma gondii</i>	15
I.4.1. Les outils d'analyse génétique	15
I.4.2. Déterminants de l'évolution de la diversité génétique de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
I.4.2.1. La dichotomie domestique <i>versus</i> sauvage	19
I.4.2.2. La dichotomie Amérique du Sud <i>versus</i> reste du monde	22
I.4.2.3. La dichotomie lignées clonales transcontinentales <i>versus</i> lignées clonales régionales ou locales	22
I.5. Objectifs	23
Chapitre II. Diversité génétique de <i>Toxoplasma gondii</i> en Afrique : revue de la littérature	27
II.1. Introduction	27
II.2. Article 1 : Galal L, Ajzenberg D, Hamidović A, Durieux MF, Dardé ML, Mercier A. <i>Toxoplasma</i> and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. <i>Trends in Parasitology</i> . 2018 Feb;34(2):140-154.	28
II.3. Principaux résultats	48
Chapitre III. <i>Toxoplasma gondii</i> chez les rongeurs et autres petits mammifères commensaux du Sénégal	50
III.1. Épidémiologie de <i>Toxoplasma gondii</i> chez les rongeurs : point bibliographique	51
III.1.1. Introduction	51
III.1.2. Techniques de détection de l'infection <i>par Toxoplasma gondii</i> chez les rongeurs	51
III.1.2.1. La détection sérologique	52
III.1.2.2. La détection moléculaire	52
III.1.2.3. L'isolement de <i>Toxoplasma gondii</i> par inoculation à la souris	53
III.1.2.4. Comparaison des techniques de détection	53
III.1.3. L'apport des études empiriques dans la compréhension de l'épidémiologie de <i>Toxoplasma gondii</i> chez les rongeurs	54
III.1.3.1. Voies de transmission de <i>Toxoplasma gondii</i> chez les rongeurs	54
III.1.3.1.1. La transmission orale	54
III.1.3.1.2. La transmission verticale	54
III.1.3.1.3. La transmission vénérienne	56
III.1.3.2. Susceptibilité et résistance des rongeurs à l'infection <i>par Toxoplasma gondii</i>	56
III.1.3.2.1. Génétique de l'hôte et génétique du parasite	56
III.1.3.2.2. Effet de l'inoculum et du stade infectieux	57
III.1.3.2.3. Effet des co-infections impliquant <i>Toxoplasma gondii</i> et un autre organisme infectieux	58
III.1.3.3. Rôle de la manipulation parasitaire dans le cycle de <i>Toxoplasma gondii</i>	59
III.1.3.4. Rôle des facteurs environnementaux dans le cycle de <i>Toxoplasma gondii</i> ..	59
III.1.4. L'apport de la modélisation dans la compréhension de l'épidémiologie de <i>Toxoplasma gondii</i> chez les rongeurs	60
III.1.5. Conclusion	61

III.2. <i>Toxoplasma gondii</i> chez les rongeurs et autres petits mammifères commensaux du Sénégal : étude de terrain.....	62
III.2.1. Introduction.....	62
III.2.2. Principaux résultats	89
Chapitre IV. Rôle des rongeurs commensaux dans l'évolution de la structure des populations de <i>Toxoplasma gondii</i> chez la faune domestique du Sénégal	91
IV.1. Introduction.....	91
IV.2. Principaux résultats	120
Chapitre V. Discussion générale	122
V.1. Approches méthodologiques	122
V.1.1. Approches méthodologiques : Les sources de prélèvements.....	122
V.1.1.1. Les captures de rongeurs	122
V.1.1.2. L'échantillonnage de volailles domestiques	123
V.1.1.3. L'échantillonnage d'animaux retrouvés morts en bord de route	124
V.1.1.4. L'échantillonnage d'animaux réalisé dans le cadre de chasses légales	124
V.1.2. Approches méthodologiques : La conception du plan d'échantillonnage	125
V.1.3. Approches méthodologiques : La caractérisation génétique des souches	125
V.1.3.1. Le génotypage direct à partir de prélèvements de terrain	125
V.1.3.2. Le génotypage après isolement de la souche par inoculation à la souris de laboratoire.....	126
V.1.4. Approches méthodologiques : conclusion et perspectives.....	127
V.2. Déterminants de la structure spatiale des populations de <i>Toxoplasma gondii</i> : avancées et perspectives	128
V.2.1. Voies migratoires et structure des populations	128
V.2.2. Pressions de sélection et structure des populations	129
V.3. Implications en santé humaine	131
V.3.1. Diversité génétique en Afrique	131
V.3.2. Voies de migration	132
V.3.3. Hybridations et introgressions génomiques	132
Références bibliographiques	134
Annexes	146

Table des illustrations

Figure 1 : Scientifiques impliqués dans la découverte de <i>Toxoplasma gondii</i>	12
Figure 2 : Cycle de transmission de <i>Toxoplasma gondii</i> Source : Adapté de Robert-Gangneux et Dardé, 2012	13
Figure 3 : stades parasitaires de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
Figure 4 : Structure génétique des populations de <i>Toxoplasma gondii</i>	18
Figure 5 : Répartition géographique des génotypes de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
Figure 6 : Structure spatiale des populations de <i>Toxoplasma gondii</i> à l'échelle de la Guyane française : populations sauvages versus populations domestiques.	21
Figure 7 : Répartition des génotypes de <i>Toxoplasma gondii</i> le long d'un gradient spatial de la ferme au milieu sauvage en Amérique du Nord.....	21
Figure 8 : Sénégal.....	24
Figure 9 : Évolution des assemblages d'espèces de petits mammifères commensaux au Sénégal entre 1983 et 2014.	25

Liste des publications

Galal L, Sarr A, Cuny T, Brouat C, Sembène M, Diagne M, Diallo M, Sow A, Hamidović A, Plaut N, Dardé ML, Ajzenberg D, and Mercier A. Role of human activities and host-mediated selection of strains in shaping *Toxoplasma gondii* population structure: the example of Senegal. En soumission dans *Plos Neglected Tropical Diseases*.

Galal L, Schares G, Stragier C, Vignoles P, Brouat C, Cuny T, Dubois C, Rohart T, Glodas C, Dardé ML, Kane M, Niang Y, Diallo M, Sow A, Aubert D, Hamidović A, Ajzenberg D, Mercier A. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains shaped by commensal communities of small mammals. Accepté dans *International Journal for Parasitology*.

Brouat C, Diagne CA, Ismaïl K, Aroussi A, Dalecky A, Bâ K, Kane M, Niang Y, Diallo M, Sow A, **Galal L**, Piry S, Dardé ML, Mercier A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in commensal rodents sampled across Senegal, West Africa. *Parasite*. 2018;25:32.

Galal L, Ajzenberg D, Hamidović A, Durieux MF, Dardé ML, Mercier A. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends in Parasitology*. 2018 Feb;34(2):140-154.

Chaichan P, Mercier A, **Galal L**, Mahittikorn A, Ariey F, Morand S, Boumédiène F, Udonsom R, Hamidovic A, Murat JB, Sukthana Y, Dardé ML. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017 Jun 3;53:227-238.

Liste des communications orales

Spatial structure of *Toxoplasma gondii* genetic diversity in Senegal: role of maritime trade? In Journée GEIST, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Limoges, France, Dec 2017.

Spatial structure of *Toxoplasma gondii* genetic diversity in Senegal: role of maritime trade? In Toxo-14 Conférence 2017, Tomar, Portugal, Jun 2017.

Structure spatiale de la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* au Sénégal : rôle du commerce maritime ? In Congrès de la Société Française de Parasitologie, Toulouse, France, March 2017.

Introduction

De nos jours, plus de 75% des maladies infectieuses émergentes sont des zoonoses (Gebreyes et al., 2014). Parmi ces pathogènes, *Toxoplasma gondii* est probablement le plus ubiquiste. Ce parasite zoonotique est un protozoaire intracellulaire de la sous-classe des coccidies et du phylum Apicomplexa. Il montre un très large spectre d'hôtes potentiels, puisqu'il est théoriquement capable d'infecter toutes les espèces homéothermes, oiseaux et mammifères, dont l'Homme. Chez l'Homme, des estimations évaluent la prévalence de l'infection par *T. gondii* à un tiers de la population mondiale (Montoya and Liesenfeld, 2004). La toxoplasmose humaine montre des expressions cliniques diversifiées et on note une forte variabilité géographique dans la sévérité des formes de la maladie (Montoya and Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux and Dardé, 2012). Les formes sévères de la toxoplasmose chez l'immunocompétent, en particuliers oculaires, représentent un problème de santé publique non négligeable en Amérique du Sud, probablement du fait des souches pathogènes de *T. gondii* qui circulent dans ce continent (Carme et al., 2002; Khan et al., 2006; Demar et al., 2007; Gilbert et al., 2008; de-la-Torre et al., 2013). A contrario, la charge de morbidité liée à la toxoplasmose en Europe et à l'Amérique du Nord ne concerne principalement que certains groupes à risque comme les femmes enceintes et les individus immunodéprimés, les souches du parasite dans ces deux continents étant peu pathogènes pour les individus immunocompétents (Dardé, 2008). Un nombre croissant d'études montre l'importance de considérer l'influence du facteur souche parasitaire dans l'étude de l'épidémiologie de la toxoplasmose humaine du fait du fort contraste géographique observé dans la diversité et dans la virulence des souches à l'échelle globale (Ajzenberg et al., 2004; Khan et al., 2006; Dardé, 2008; Xiao and Yolken, 2015). Cependant, la diversité des souches de *T. gondii* demeure très peu explorée dans certaines régions du monde comme l'Asie et l'Afrique (Mercier et al., 2010; Shwab et al., 2014; Chaichan et al., 2017). De plus, les déterminants de la structure spatiale de cette diversité à travers le monde et les facteurs qui contribuent à son évolution demeurent mal connus. D'autre part, la globalisation des échanges semble provoquer des situations à risque encore peu explorées qui constituent des défis nouveaux en recherche et en santé publique. En France, des cas de toxoplasmoses humaines sévères ont été rapportées dus à la consommation de viandes de cheval sud-américaines importées et contaminées par des souches très virulentes du parasite (Elbez-Rubinstein et al., 2009; Pomares et al., 2011). En plus du transport de produits carnés contaminés, le transport d'animaux domestiques ou celui, involontaire, de nuisibles infectés par *T. gondii* pourrait contribuer à la dissémination transcontinentale de souches du parasite. Ces voies potentielles de dissémination ont été évoquées dans la littérature scientifique mais demeurent hypothétiques (Lehmann et al., 2006; Mercier et al., 2010). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle du commerce maritime passé et actuel sur l'évolution de la structure des populations de *T. gondii* à l'échelle globale. Durant la période coloniale, les navigateurs européens ont involontairement été à l'origine d'invasions majeures d'espèces de rongeurs commensaux depuis l'Europe vers l'Amérique et l'Afrique (Tichy et al., 1994; Erynk, 2002; Long, 2003; Bonhomme et al., 2011). Ces rongeurs ont été introduits au niveau des comptoirs coloniaux établis dans ces deux continents avant de progressivement se propager vers l'intérieur des terres. Nous avons voulu évaluer dans quelle mesure l'introduction du rat noir et de la souris domestique au Sénégal (Dalecky et al., 2015), un pays d'Afrique de l'Ouest qui a été au cœur du commerce colonial pendant plusieurs siècles, a pu contribuer à l'évolution des populations de *T. gondii*

dans ce pays. Dans cette étude, nous avons réalisé des campagnes de prélèvement sur le terrain au Sénégal pour l'isolement de souches de *T. gondii* à partir d'animaux divers, en particulier de rongeurs et de volailles. Des analyses de génétique des populations ont été réalisées sur ces souches pour déterminer les mécanismes évolutifs qui ont contribué à façonner la structure actuelle des populations du parasite.

Chapitre I. Généralités sur *Toxoplasma gondii* et objectifs de la thèse

I.1. Historique de la découverte de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii fut découvert pour la première fois par Charles Nicolle (Figure 1A) et Louis Manceaux en 1908, deux chercheurs de l'institut Pasteur de Tunis, dans le cadre de recherches visant à identifier les réservoirs de la leishmaniose cutanée et viscérale dans des régions de l'actuelle Tunisie (Nicolle, 1908). L'examen de prélèvements réalisés chez deux rongeurs de l'espèce *Ctenodactylus gundi* capturés dans la région du canyon de Toujane a permis d'observer pour la première fois un parasite morphologiquement proche, quoique clairement distinct, des amastigotes de leishmanies. Ce parasite, plus allongé, ne présentant pas de centrosome et incapable de se multiplier dans les milieux de culture dédiés aux leishmanies, a donné lieu à la proposition par Nicolle d'un genre nouveau : le genre *Toxoplasma* (du grec toxon ou arc en référence à sa morphologie). C'est cette même année qu'Alfonso Splendore (Figure 1B) annonce sa découverte d'un parasite morphologiquement similaire au parasite décrit par Nicolle et Manceaux, isolé chez un lapin dans son laboratoire de São Paulo au Brésil où il mène ses recherches sur les leishmanioses du nouveau monde (Splendore, 1908).

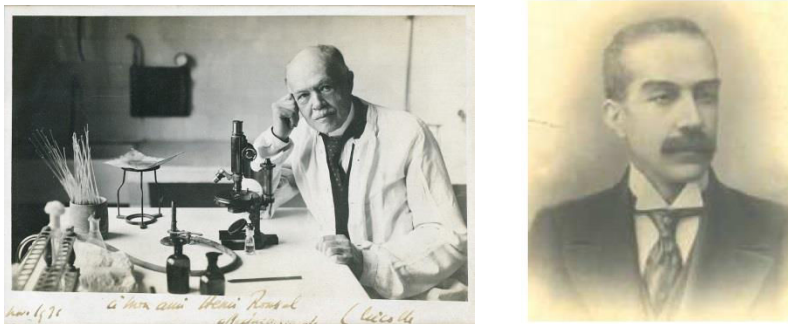


Figure 1 : Scientifiques impliqués dans la découverte de *Toxoplasma gondii*
A gauche Charles Nicolle (1866-1936), à droite Alfonso Splendore (1871-1953)

I.2. Cycle de transmission et modes d'infection

Le chat domestique et les autres espèces sauvages de félinidés sont les hôtes définitifs de *T. gondii*, alors que toutes les autres espèces homéothermes, oiseaux et mammifères, sont des hôtes intermédiaires potentiels de ce parasite (Figure 2). Chez l'hôte définitif, lors d'une primo-infection, *T. gondii* envahit et se multiplie dans les entérocytes du félin qui a ingéré une proie infectée. Certains de ces parasites vont se différencier en gamétocytes mâle et femelle lors de la phase de la gamétogonie, ce qui va donner lieu à la formation d'ocystes non sporulés et non infectieux (Figure 3C). Trois à 5 jours après l'infection, sur une période de 7 à 15 jours, le félinid va éliminer des millions d'ocystes via ses déjections, qui vont contaminer l'environnement. Dans la plupart des cas, un hôte définitif infecté va acquérir une immunité à *T. gondii* qui empêchera l'incidence de nouveaux cycles de dissémination d'ocystes si ce chat est exposé une nouvelle fois au parasite. Les ocystes vont ensuite sporuler (Figure 3D) dans le milieu extérieur et acquérir leur infectiosité pour devenir la principale source d'infection pour la plupart des hôtes intermédiaires, du fait de leur viabilité qui se maintient souvent durant plusieurs mois dans l'environnement en fonction des

conditions climatiques. Les oocystes ingérés par les hôtes intermédiaires se différencient en tachyzoïtes (Figure 3A) dans les cellules épithéliales de l'intestin. Ces tachyzoïtes vont d'abord initier une première phase de multiplication dans les cellules de l'intestin, avant de migrer vers les autres organes via la circulation. Chez plusieurs espèces de mammifères dont l'Homme, dans le cas de l'incidence d'une infection par *T. gondii* durant la gestation, les tachyzoïtes peuvent causer l'infection du fœtus après passage de la barrière transplacentaire, qui montre une perméabilité croissante avec l'avancement de la grossesse et une perméabilité maximale durant le dernier tiers de cette période. Au bout de quelques jours, la mise en place d'une réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre *T. gondii* met fin à la phase aiguë de l'infection. Les tachyzoïtes en circulation, pour échapper au système immunitaire de l'hôte, vont se différencier en bradyzoïtes intracellulaires regroupés sous forme de kystes circulaires dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 3B) ; c'est le début de la phase chronique qui peut persister durant toute la vie de l'hôte. La consommation de tissus d'animaux infectés contenant des kystes de *T. gondii* est une source d'infection pour l'homme et pour les espèces carnivores ou les charognards. Surtout, elle permet le renouvellement du cycle de transmission si un félin non immunisé par une infection antérieure consomme les tissus d'une proie infectée.

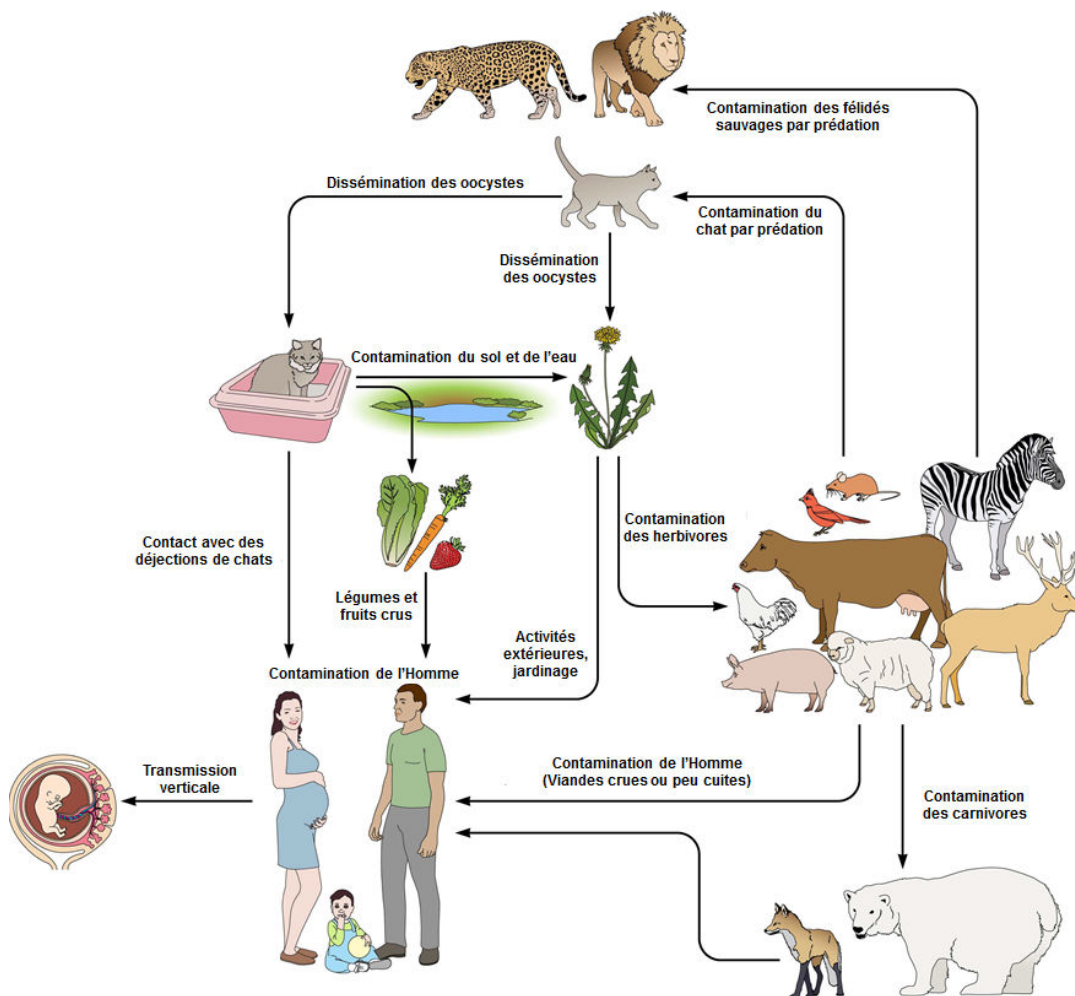


Figure 2 : Cycle de transmission de *Toxoplasma gondii*
 Source : Adapté de Robert-Gangneux et Dardé, 2012

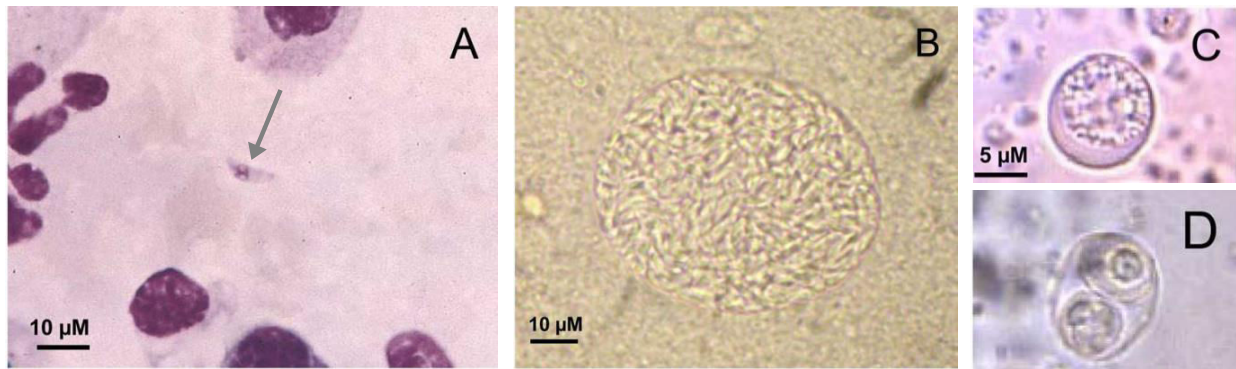


Figure 3 : stades parasitaires de *Toxoplasma gondii*.

(A) tachyzoïte [grossissement x500], (B) un kyste dans le cerveau d'une souris infectée [grossissement x500], (C) un oocyste non sporulé [grossissement x1000] (D) et sporulé [grossissement x1000].

Source : Adapté de Robert-Gangneux et Dardé, 2012

I.3. La toxoplasmose humaine

La toxoplasmose humaine est le plus souvent asymptomatique (Montoya and Liesenfeld, 2004; Dardé, 2008). Les formes cliniques les plus répandues sont (a) la forme congénitale, souvent asymptomatique mais qui peut être caractérisée par des symptômes neurologiques et oculaires chez le nouveau-né ou l'enfant, (b) la forme oculaire acquise après la naissance et (c) la forme cérébrale chez l'adulte (encéphalite), principalement liée à une réactivation d'une infection chronique suite à une immunodépression sévère (SIDA, traitement immunosuppresseur, etc). Cependant, en Amérique du Sud tropicale ou sub-tropicale, on observe une prévalence élevée de formes oculaires sévères, pouvant représenter un problème de santé publique important en particulier au Brésil, en Colombie et au nord de l'Argentine (Glasner et al., 1992; Gilbert et al., 2008; de-la-Torre et al., 2013; Rudzinski et al., 2016). De plus, de nombreux cas de toxoplasmoses multiviscérales ont également été rapportés en Guyane française, probablement causés par des souches très pathogènes du parasite issues du milieu sauvage, le plus souvent suite à des séjours dans la forêt amazonienne (Carme et al., 2002). En Asie et en Afrique, les données épidémiologiques et cliniques concernant la toxoplasmose demeurent très limitées.

La virulence de la souche de *T. gondii* pour un hôte donné et la vulnérabilité immunitaire de l'hôte infecté, qu'elle soit génétique (Rudzinski et al., 2016) ou acquise suite à une immunodépression (Ajzenberg et al., 2009), semblent jouer un rôle important dans la variabilité des formes cliniques observées et dans leurs sévérités respectives (Maubon et al., 2008). Une épidémie dans un village du Surinam (Demar et al., 2007) causée par une souche de *T. gondii* avec un génotype atypique a été à l'origine d'un nombre de cas relativement important de toxoplasmose parmi les habitants (11 sur les 33 habitants du village). Une variabilité importante dans la sévérité du tableau clinique a ainsi été relevée chez des populations *a priori* relativement homogènes sur le plan génétique et ethnique (Blaizot et al., 2018). D'autres facteurs, comme l'âge, le stade infectieux (oocystes ou bradyzoïtes), la dose infectieuse et la prévalence de co-infections (par d'autres souches de *T. gondii* ou par d'autres pathogènes) pourraient expliquer cette variabilité.

I.4. La diversité génétique de *Toxoplasma gondii*

Les premières études portant sur la diversité des isolats de *T. gondii* ont été motivées par une volonté de comprendre les déterminants de la variabilité clinique observée, avec notamment l'hypothèse d'un rôle de la souche infectante dans cette variabilité.

I.4.1. Les outils d'analyse génétique

Les premières données relatives à la diversité des souches de *T. gondii* étaient phénotypiques. Elles étaient collectées par l'observation clinique d'animaux de laboratoire soumis à des infections expérimentales par différentes souches du parasite. Chez la souris de laboratoire par exemple, certaines souches (isolées chez l'homme ou l'animal) étaient non virulentes alors que d'autres conduisaient à une toxoplasmose fatale chez ce même hôte (Nicolle, 1914; Suzuki et al., 1989). Par la suite, des méthodes basées sur le typage isoenzymatique (Dardé et al., 1988; Dardé et al., 1992) et le génotypage (Cristina et al., 1991a, 1991b; Sibley and Boothroyd, 1992; Howe and Sibley, 1995) des isolats de *T. gondii*, ont commencé à être développées à partir des années 1980 et 1990. A cette époque, *T. gondii* était considéré comme un parasite à reproduction exclusivement clonale, dont la diversité génétique se limitait à 3 lignées clonales appelées types I, II et III. Il était donc admis que l'analyse génétique d'un seul locus du génome était suffisante pour déterminer à laquelle des 3 lignées appartenait une souche. La découverte ultérieure d'une diversité plus complexe témoignant de l'existence d'une reproduction sexuée chez ce parasite a rendu indispensable la conduite d'analyses multilocus dans la caractérisation génétique des souches. En effet, l'analyse multilocus, plus représentative du génome, permet une détermination plus fiable de la composition allélique d'une souche et la détection d'éventuelles recombinaisons génomiques. Aujourd'hui, deux méthodes de génotypage ont réussi à s'imposer et sont largement employées dans les différentes études en lien avec la diversité génétique de *T. gondii* de par le monde : le génotypage multilocus par analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) et le génotypage multilocus par analyse du polymorphisme de longueur de séquences microsatellites.

Le génotypage RFLP, simple et peu coûteux, a d'abord été développé avec l'analyse d'un unique marqueur au début des années 90 (Cristina et al., 1991b). D'autres marqueurs RFLP ont progressivement été mis au point et ajoutés à la technique par la suite ; la méthode employée actuellement est basée sur l'analyse de 10 marqueurs répartis sur 8 chromosomes et d'un marqueur apicoplastique (Su et al., 2006; Dubey et al., 2007). Un numéro spécifique est attribué à chaque génotype selon la codification adoptée par le système de désignation *ToxoDB* (www.toxodb.org/).

L'analyse de séquences microsatellites a été développée pour atteindre un degré de résolution plus élevé dans la distinction génétique des souches. Les marqueurs microsatellites, plus polymorphes, sont en effet utiles pour tracer les événements récents de l'histoire évolutive des organismes vivants. La première technique de génotypage microsatellites pour *T. gondii* était basée sur l'analyse de 8 marqueurs (Ajzenberg et al., 2002). Aujourd'hui, la méthode la plus récente et la plus communément employée est basée sur l'analyse de 15 marqueurs répartis sur 11 chromosomes différents (Ajzenberg et al., 2010).

La désignation des lignées clonales caractérisées par cette technique se réfère le plus souvent à leur origine géographique (par exemple *Chinese 1* ou *Africa 3*). L'appellation

« génotype unique ou atypique » est attribuée aux souches n'appartenant à aucune des lignées clonales définies par cette méthode de génotypage. Un tableau récapitulatif par Chaichan et collaborateurs (2017) résume les équivalences établies entre les génotypes RFLP et les génotypes microsatellites (Annexe 1).

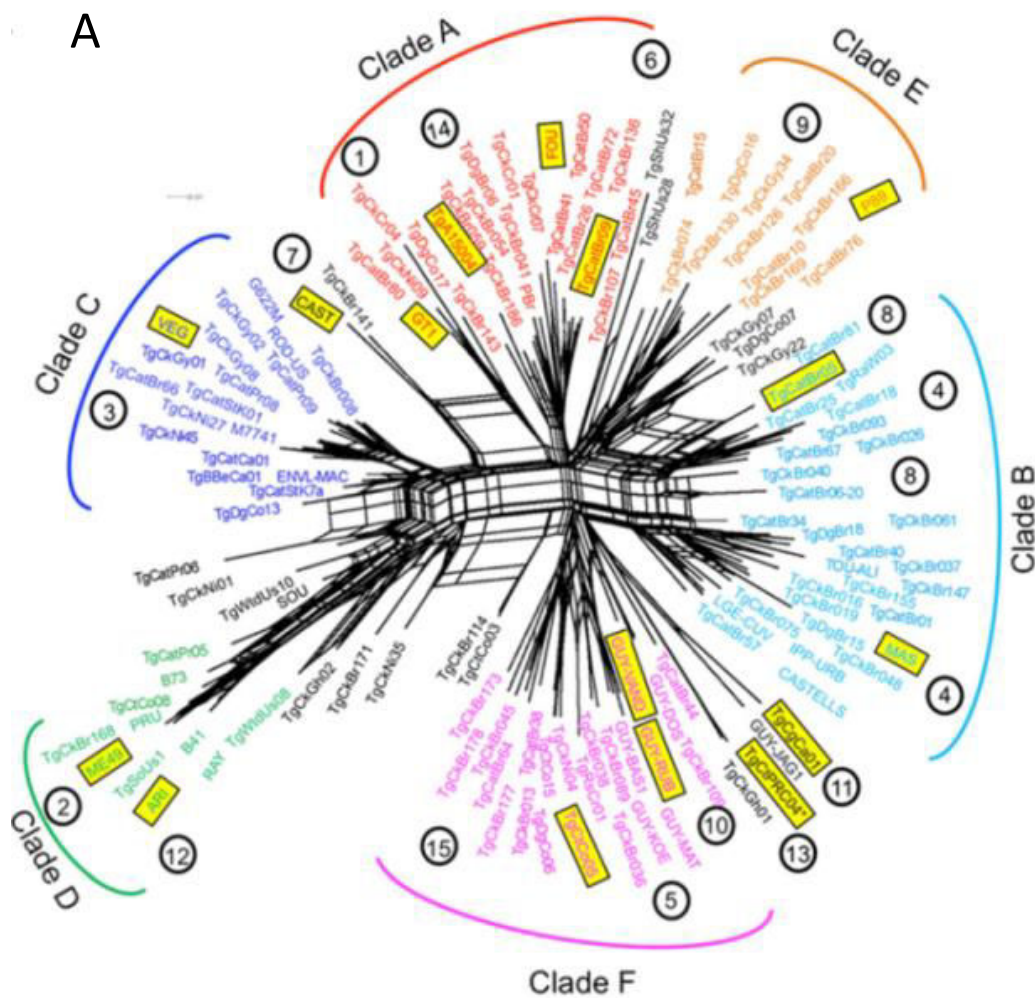
En plus de ces méthodes utilisées en routine pour le génotypage, d'autres basées sur le séquençage de gènes multilocus (MLST) ou de génome complet ont été utilisées plus ponctuellement dans le cadre d'études de phylogénie ou de génétique des populations visant à caractériser l'origine de *T. gondii* (Khan et al., 2007; Bertranpetit et al., 2017) ou la structure globale des populations du parasite (Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016).

I.4.2. Déterminants de l'évolution de la diversité génétique de *Toxoplasma gondii*

Les premiers travaux portant sur la diversité génétique de *T. gondii* à travers le monde ont étudié des isolats humains ou provenant d'animaux domestiques essentiellement originaires d'Europe et d'Amérique du Nord, avec l'analyse d'un nombre limité de marqueurs moléculaires (de 3 à 6 marqueurs) (Sibley and Boothroyd, 1992; Howe and Sibley, 1995). L'échantillonnage biaisé et le faible pouvoir résolutif des méthodes de génotypage employées ont conduit initialement à une sous-estimation de la diversité génétique du parasite, avec 3 lignées clonales prédominantes identifiées : les types I, II et III, qualifiées plus tard de lignées archétypales (Grigg et al., 2001). Par la suite, des études basées sur un échantillonnage plus diversifié, en terme d'hôte et de répartition géographique, ont permis de révéler une diversité génétique beaucoup plus complexe du parasite (Ajzenberg et al., 2004; Lehmann et al., 2004). L'analyse d'un plus grand nombre de marqueurs (Su et al., 2006) et le développement de méthodes d'analyse génétique plus résolutive comme les microsatellites (Ajzenberg et al., 2002, 2004, 2010) ou le séquençage de gènes (Khan et al., 2007) ont également été un levier important pour la découverte de cette diversité. Les études successives portant sur la diversité globale de *T. gondii* ont pu s'appuyer sur un nombre croissant d'isolats disponibles avec 11 haplogroupes décrits en 2007 par analyse de séquences (Khan et al., 2007), jusqu'à 15 haplogroupes en 2012 (Su et al., 2012) et un 16^{ème} haplogroupe décrit récemment (Lorenzi et al., 2016). Si certains d'entre eux sont soutenus par des souches génétiquement homogènes appartenant à des lignées clonales bien définies, d'autres haplogroupes forment des ensembles génétiques beaucoup plus hétérogènes (Figure 4). Cet effet est probablement causé par des souches recombinantes qui ne montrent pas d'appartenance claire à un haplogroupe en particulier. Comme souligné par Wendte et collaborateurs (2011), nous ignorons si ces haplogroupes représentent des entités phylogénétiques réelles, ou plutôt des points qui se confondront dans un continuum au fur et à mesure que d'autres isolats seront décrits.

Dans la majorité des régions explorées, une structure majoritairement clonale des populations de *T. gondii* a pu être mise en évidence (Figure 5). Un nombre limité de lignées prédominantes, transcontinentales ou régionales, semble constituer l'essentiel de la diversité du parasite. En Europe, les souches de type II et, dans une moindre mesure, celles de type III, sont très largement majoritaires, que ce soit en milieu domestique ou sauvage (Howe and Sibley, 1995; Ajzenberg et al., 2002; Richomme et al., 2009). En Amérique du Nord, les isolats domestiques sont comparables à ceux d'Europe (types II et III), mais ce sont les souches appartenant à l'haplogroupe 12 qui prédominent en milieu sauvage (Dubey et al., 2011; Su et al., 2012). Une proportion non négligeable de souches atypiques uniques a pu être identifiée sur ce continent au sein de la faune sauvage, mais également chez les

animaux domestiques en pâturage qui doivent probablement empiéter sur les domaines vitaux de certains félidés sauvages (Jiang et al., 2018). En Asie et en Afrique, même si peu de données existent et en particulier pour le milieu sauvage, les souches génotypées ont, à ce jour, été le plus souvent classifiées comme appartenant à un nombre limité de lignées transcontinentales (types II et III) et régionales comme *Chinese 1* en Chine (Chaichan et al., 2017) ou *Africa 1* et *Africa 3* en Afrique (Ajzenberg et al., 2009; Mercier et al., 2010). Cette tendance globale ne s'applique cependant pas aux pays tropicaux d'Amérique du Sud, où la diversité génétique du parasite est beaucoup plus importante. En milieu domestique, même si certaines lignées clonales locales ont pu être identifiées, on observe une proportion significative de souches atypiques qui ne semblent pas s'intégrer dans un schéma de propagation exclusivement clonale, mais témoigneraient plutôt d'une incidence fréquente de recombinaisons génomiques génératrices de diversité (Shwab et al., 2014). Dans la partie non anthropisée de la forêt amazonienne qui représente un milieu authentiquement sauvage, les souches de *T. gondii* sont très diversifiées et la structure des populations du parasite semble compatible avec un mode panmictique de reproduction (Mercier et al., 2011). Nous observons donc des dichotomies dans la structure des populations à plusieurs échelles : (1) domestique *versus* sauvage, (2) Amérique du Sud *versus* reste du monde et (3) lignées clonales transcontinentales *versus* lignées clonales régionales ou locales.



B

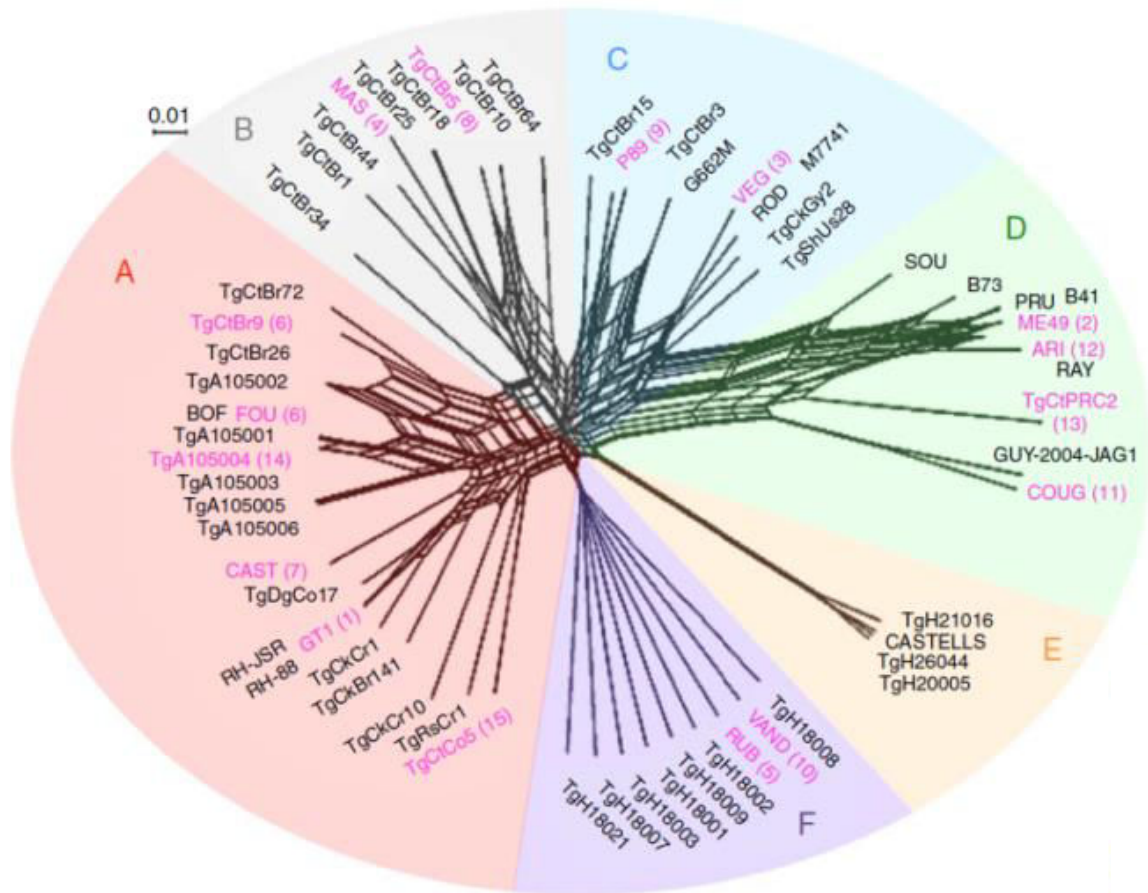


Figure 4 : Structure génétique des populations de *Toxoplasma gondii*.

(A) Arbre de Neighbour-net basé sur l'analyse de 138 souches avec 11 marqueurs RFLP, un marqueur apicoplastique et 4 séquences d'introns. Les numéros d'haplogroupe sont indiqués par les cercles noirs (Su et al., 2012), (B) Arbre de Neighbour-net basé sur l'analyse des SNP du génome (802 764 points de données communes) de 62 isolats. La roue de couleur indique les principaux clades de *T. gondii*. Les noms en caractères roses désignent les souches représentatives de chaque haplogroupe. Les numéros d'haplogroupe sont indiqués entre parenthèses (Lorenzi et al., 2016).

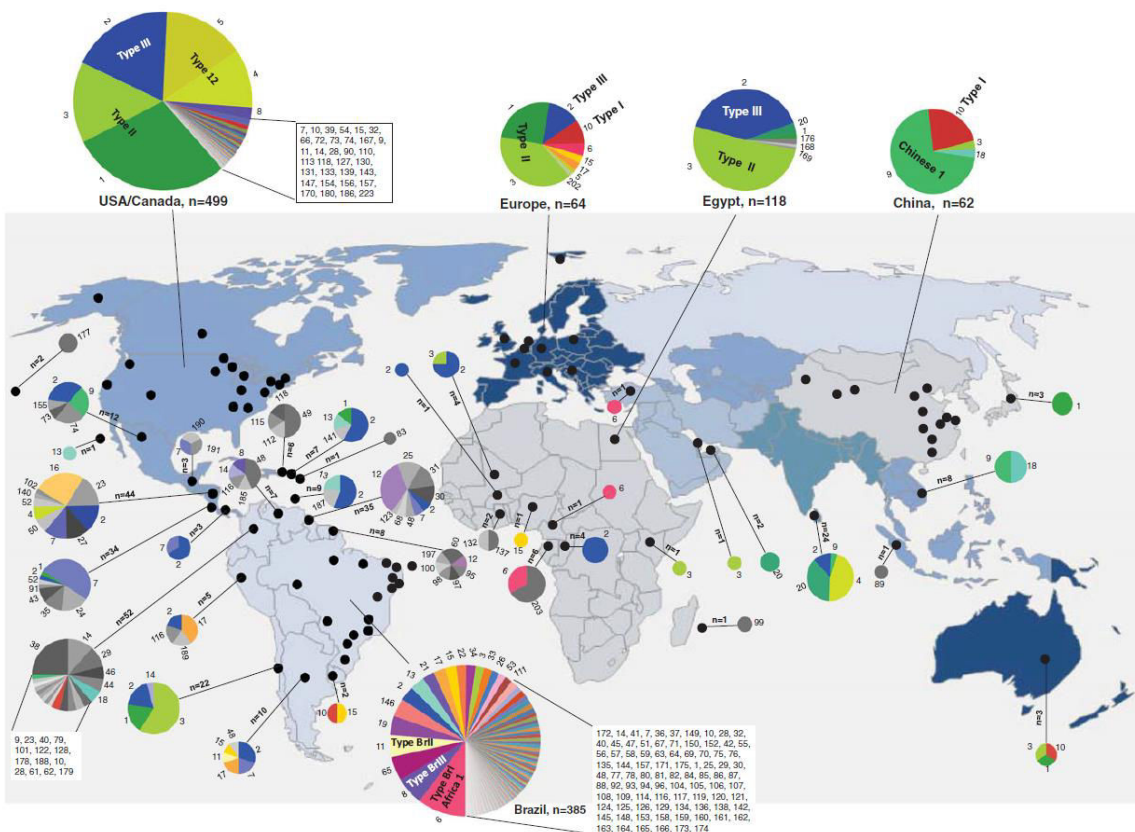


Figure 5 : Répartition géographique des génotypes de *Toxoplasma gondii*.

Les points noirs indiquent les endroits à partir desquels des isolats de *T. gondii* ont été obtenus. Les chiffres autour des bords des diagrammes indiquent les génotypes ToxoDB PCR-RFLP. Dans certains cas, d'autres désignations de type de souche sont superposées sur les diagrammes circulaires en caractères gras. La taille des diagrammes circulaires correspond au nombre total d'isolats (n) et les couleurs indiquent des génotypes différents.

Source : Shwab et al., 2014

I.4.2.1. La dichotomie domestique *versus* sauvage

Toxoplasma gondii est théoriquement capable de parasiter toutes les espèces homéothermes, ce qui lui offre une multitude de niches écologiques au sein de la faune sauvage. Cette diversité d'hôtes potentiels soumettrait néanmoins *T. gondii* à des pressions de sélection différentes qui conduiraient à une diversification importante des allèles de ce parasite pour optimiser son adaptation à toutes ces niches écologiques disponibles (Ajzenberg et al., 2004). A l'opposé, le chat domestique et un petit nombre d'hôtes intermédiaires constituent l'ensemble des niches écologiques disponibles pour *T. gondii* en milieu domestique. Ce spectre réduit d'hôtes potentiels favoriserait probablement la transmission d'un nombre limité de souches de *T. gondii* spécifiquement adapté à ces hôtes. Dans ce sens, Mercier et collaborateurs (2011) ont mis en évidence une séparation génétique claire entre les souches qui circulent dans la forêt amazonienne en Guyane française et les souches de l'environnement domestique (Figure 6). La même dichotomie semble prévaloir en Amérique du Nord entre l'environnement sauvage et l'environnement domestique (Figure 7), quoique de manière moins marquée (Jiang et al., 2018). Les félinés

sauvages, présents en grand nombre dans ces deux continents, pourraient être à l'origine du maintien d'un cycle sylvatique de *T. gondii* bien distinct du cycle domestique. En effet, en Europe où les félidés sauvages sont devenus très rares, c'est la lignée domestique de type II qui circule principalement chez la faune sauvage (Richomme et al., 2009). Les cycles sylvatiques de *T. gondii* en Afrique et en Asie demeurent largement inconnus.

D'autre part, Khan et al., (2014) ont montré que des souches domestiques représentatives de la diversité globale de *T. gondii* partageaient quasiment toutes une version monomorphe très conservée du chromosome Ia. En revanche, chez les isolats sauvages d'Amazonie, une forte variabilité génétique des séquences de ce chromosome a pu être démontrée. Des infections expérimentales de chats par des souches domestiques de *T. gondii* (4 souches pour 8 chats) et sauvages (3 souches pour 6 chats) ont montré que ces deux types de souches n'avaient pas la même propension à être transmises par le chat domestique. Les 4 souches domestiques ont entraîné une excrétion d'oocystes chez 6 des 8 chats exposés (2 souches ayant causé une excrétion d'oocystes chez un seul des 2 chats exposés) alors que les 3 souches sauvages ont été associées à une excrétion d'oocystes chez uniquement un des 6 chats exposés. Ce *Chrla* monomorphe pourrait donc conférer un avantage sélectif aux souches qui le possèdent dans leur transmission par le chat domestique et donc dans leur propagation dans le milieu domestique. Des infections expérimentales réalisées sur un plus grand nombre de chats et par une diversité de souches plus importante permettraient de confirmer ce résultat. L'existence de ce *Chrla* monomorphe chez les souches domestiques est un argument en faveur de l'hypothèse d'un passé récent commun à toutes les souches domestiques isolées à travers le monde. Les souches domestiques actuelles n'auraient donc pas émergé de manière indépendante à partir du milieu sauvage dans diverses régions du monde du fait d'une possible préadaptation à la transmission par le chat domestique comme précédemment proposé par Grigg et Sundar (2009). L'hypothèse la plus plausible est qu'un allèle ou plusieurs allèles plus avantageux pour la transmission en milieu domestique auraient émergé du milieu sauvage au moment de la révolution néolithique et de l'avènement de l'agriculture. L'expansion de l'agriculture, la propagation du chat domestique, du rat et de la souris auraient ensuite permis la dissémination transcontinentale des souches porteuses de ces allèles (Khan et al., 2011, 2014). Par la suite, de possibles hybridations entre ses souches invasives et les souches circulant dans les zones envahies auraient contribué à l'apparition de souches « régionales » uniques également adaptées à la transmission par le chat. Cela expliquerait, malgré les liens entre les souches domestiques à travers le monde, les divergences génétiques qui existent entre les différentes lignées décrites.

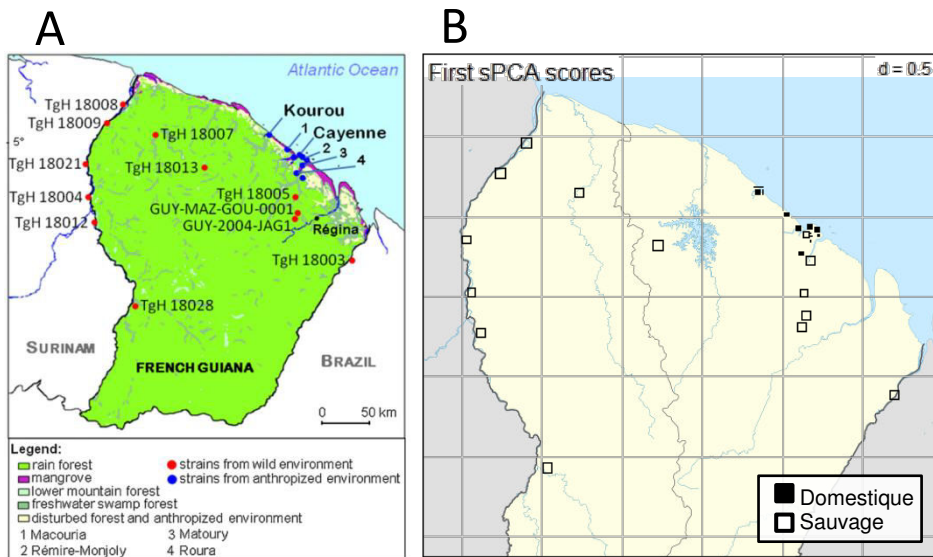


Figure 6 : Structure spatiale des populations de *Toxoplasma gondii* à l'échelle de la Guyane française : populations sauvages versus populations domestiques. (A) Origine géographique des souches analysées dans l'étude et le type d'environnement dont elles sont issues. (B) Structure génétique des populations de *T. gondii* obtenue par une méthode d'analyse de composantes principales spatiale (sPCA) développée par Jombart et collaborateurs (2008). Source : Mercier et al., 2011

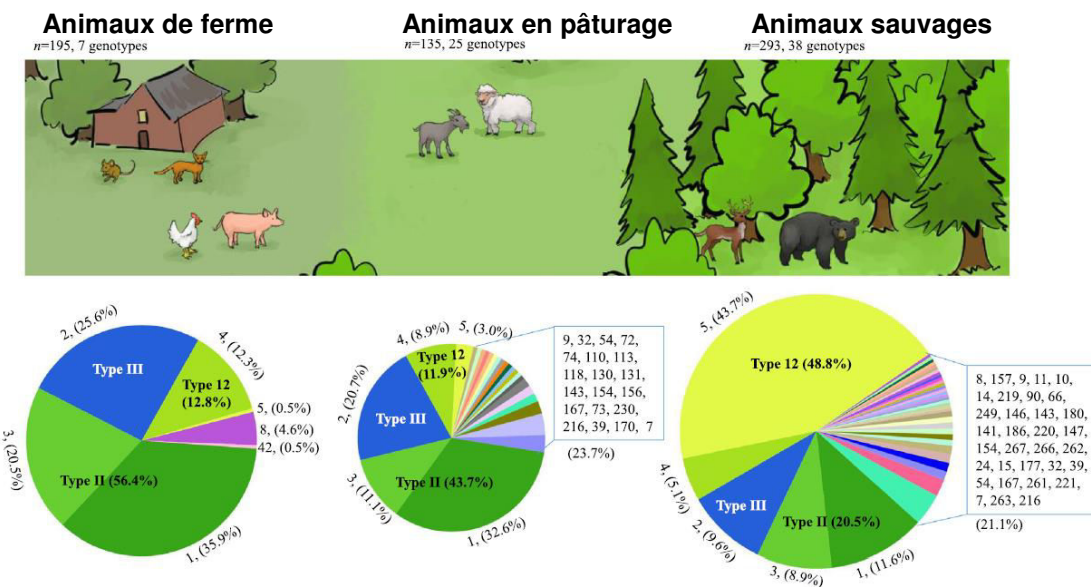


Figure 7 : Répartition des génotypes de *Toxoplasma gondii* le long d'un gradient spatial de la ferme au milieu sauvage en Amérique du Nord. Les chiffres autour des bords des diagrammes indiquent les génotypes ToxoDB PCR-RFLP des souches qui circulent chez chaque catégorie d'animaux. Les lignes archétypales (Type II, III et 12) sont représentées sur des diagrammes circulaires en caractères gras. Les tailles des diagrammes circulaires correspondent au nombre total (et au pourcentage) d'isolats ; les couleurs des tranches correspondent aux différents génotypes. Source : Jiang et al., 2018

I.4.2.2. La dichotomie Amérique du Sud *versus* reste du monde

L'Amérique du Sud se démarque significativement des autres continents par ses populations de *T. gondii* très diversifiées. L'ancêtre commun le plus récent des lignées actuelles de *T. gondii* aurait émergé il y a 1,5 Ma en Amazonie (Bertranpetit et al., 2017). Cette présence ancienne dans ce milieu, propice à une circulation intense du parasite de par son climat et sa diversité en niches écologiques, aurait favorisé la diversification des allèles de *T. gondii* et l'accumulation de mutations par dérive génétique (Ajzenberg et al., 2004).

Une hypothèse complémentaire qui pourrait expliquer la diversité génétique importante des souches de *T. gondii* en Amérique du Sud serait une incidence plus fréquente de reproductions sexuées entre des souches différentes de *T. gondii*. Dans la forêt amazonienne, où 8 espèces de félidés sauvages cohabitent, certains possèdent un vaste domaine vital, et peuvent potentiellement excréter des oocystes à des endroits distants de plusieurs dizaines de kilomètres. Cela pourrait donc conduire à une superposition dans l'espace d'oocystes excrétées par des individus différents et donc appartenant à des souches différentes de *T. gondii*. De plus, le climat et le ruissellement des eaux de pluie pourraient favoriser une longue survie des oocystes dans ce milieu et leur dissémination sur de longues distances. L'ensemble de ces phénomènes conduirait à une fréquence élevée de co-infections (ou infections mixtes) par des souches de génotype différent chez les hôtes intermédiaires évoluant dans cet environnement, ce qui se traduirait chez leurs prédateurs félins par l'excrétion de souches recombinantes après leur infection. De plus, des études expérimentales ont montré qu'une souris infectée ou vaccinée par une souche de *T. gondii* ne développait pas forcément une immunité croisée qui la protège d'une réinfection par d'autres souches du parasite, et en particulier si la deuxième souche à laquelle la souris est exposée est une souche habituellement virulente pour la souris de laboratoire dans le cas d'une primo-infection (Elbez-Rubinstein et al., 2009; Jensen et al., 2015). Comme la plupart des souches sud-américaines sont virulentes pour la souris de laboratoire, les auteurs de ces études ont notamment émis l'hypothèse que ce mécanisme pourrait être à l'origine d'une prévalence élevée de co-infections chez les hôtes intermédiaires de *T. gondii* en Amérique du Sud, qui pourraient donc potentiellement conduire à des recombinaisons génétiques génératrices de diversité chez leurs prédateurs félins. Néanmoins, les isolats obtenus dans les régions où ces souches virulentes pour la souris de laboratoire sont majoritaires (en Amérique du Sud et en Afrique tropicale) montrent que les infections mixtes sont rares (Dubey et al., 2003a, 2008; Pena et al., 2008; Mercier et al., 2010, 2011), ce qui semble en opposition avec cette hypothèse.

En résumé, si la diversité génétique importante de *T. gondii* en Amérique du Sud était due à un régime de reproduction panmictique, elle pourrait aussi s'expliquer par l'existence d'un nombre important de lignées du parasite (Dubey et al., 2007) du fait de sa présence ancienne dans ce continent, qui auraient émergé suite à de rares événements de recombinaisons.

I.4.2.3. La dichotomie lignées clonales transcontinentales *versus* lignées clonales régionales ou locales

Les voies de dissémination des souches de *T. gondii* demeurent inconnues, mais le grand nombre d'espèces potentiellement réservoirs du parasite laissent à supposer l'existence

d'une multitude de voies pour sa migration à courte ou longue distance. Outre le rôle des félidés lors de leurs migrations indépendantes ou associées aux échanges humains (Müller and Howard, 2016; Bertranpetit et al., 2017), certaines études suggèrent un rôle possible des migrations d'oiseaux dans la propagation des souches du parasite. Cette hypothèse semble plausible au vue de l'importance quantitative de ces flux qui se perpétuent depuis des millions d'années. Cependant, la présence de souches clairement différentes entre, par exemple, l'Amérique du Nord et du Sud, pourtant reliées par des flux importants d'oiseaux migrateurs, suggère que cette voie migratoire joue tout au plus un rôle secondaire dans la dissémination de *T. gondii*. Un échantillonnage plus ciblé sur les zones de regroupement d'oiseaux migrateurs permettrait d'apporter des données plus précises pour l'évaluation de cette hypothèse. Les migrations naturelles d'hôtes terrestres de *T. gondii* pourraient également avoir un rôle dans la propagation de *T. gondii* à des échelles locales ou régionales, mais leur rôle semblerait minime dans la propagation transcontinentale des souches de *T. gondii*, du moins à une échelle de temps réduite.

Aujourd'hui, si certaines lignées montrent une distribution exclusivement locale (à l'échelle d'un pays) ou régionale, certaines lignées ont réussi une propagation transcontinentale voir cosmopolite. C'est notamment le cas du type II, qui est la lignée prédominante en Amérique du Nord, en Europe et dans tout le pourtour méditerranéen (Shwab et al., 2014; Chaichan et al., 2017; Galal et al., 2017). Le type III, rarement prédominant, est tout de même la lignée actuelle la plus cosmopolite. L'émergence de ces deux lignées semble coïncider avec le début de la domestication durant le néolithique il y a environ 10 000 ans (Su et al., 2003) dans le Proche et le Moyen Orient. A partir de cette période, les migrations humaines auraient contribué à la propagation de ces deux lignées spécifiquement adaptées au milieu domestique (Shwab et al., 2018). Ce phénomène aurait pris une ampleur nouvelle à partir du XVIème siècle avec l'intensification des échanges mondiaux, qui aurait permis la propagation transcontinentale de ces deux lignées. En particulier, le transport maritime, un vecteur important de la dissémination du rat brun, du rat noir et de la souris domestique par les navires européens (Aplin et al., 2011; Bonhomme et al., 2011) et responsable de leur introduction au niveau des régions portuaires impliquées dans le commerce colonial, aurait probablement permis en même temps la dissémination des souches européennes de *T. gondii* (type II et III) dont ces rongeurs sont des réservoirs (Lehmann et al., 2006).

I.5. Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer l'influence des activités humaines sur la structuration des populations de *T. gondii* en milieu domestique. Plus spécifiquement, il s'est agi d'estimer dans quelle mesure les invasions de rongeurs qui accompagnent les échanges humains contribuent à façonner la structure des populations de *T. gondii* au niveau des régions envahies.

Pour répondre à cet objectif, nous avons choisi d'effectuer des campagnes de prélèvement et d'isolement de souches dans un pays d'Afrique de l'Ouest : le Sénégal (Figure 8). Le choix de ce pays a été motivé par des facteurs historiques qui font du Sénégal un cadre pertinent pour la conduite de notre étude et que nous développons ci-dessous :

Le Sénégal a été une plaque tournante majeure de la traite des esclaves en Afrique durant la période du commerce triangulaire. La souris domestique (*Mus musculus domesticus*) et le rat noir (*Rattus rattus*) ont été introduits au Sénégal à partir du XVIIème siècle via le commerce maritime européen (Bonhomme et al., 2011; Dalecky et al., 2015; Konečný et al.,

2013; Lippens et al., 2017). Des populations de ces deux espèces de rongeurs invasifs se sont implantées au niveau des comptoirs établis par les colons durant la période coloniale. Le commerce fluvial qui s'est développé à cette période le long du fleuve Sénégal et du fleuve Gambie, a permis une dissémination, quoique limitée, de ces rongeurs vers l'intérieur des terres (Rosevear, 1969). C'est le développement du réseau routier à partir de la deuxième moitié du XXème siècle qui a accéléré la dissémination de ces rongeurs vers l'intérieur des terres. Depuis plus de trente ans (1983-2014), des piégeages de rongeurs à travers tout le territoire sénégalais (Figure 9) ont permis un suivi précis de ces invasions toujours en cours et l'évolution des assemblages d'espèces dans toutes les régions du pays (Dalecky et al., 2015). Aujourd'hui, la souris domestique et le rat noir ont colonisé la large majorité du territoire et ont supplanté les espèces natives commensales pour devenir les rongeurs commensaux prédominants. La souris domestique a principalement investi la moitié nord du pays (plus aride), alors que le rat noir s'est propagé dans la moitié sud (plus humide). La seule grande région du Sénégal où les espèces natives commensales se maintiennent toujours est celle de Kédougou (Sud-Est du Sénégal à 650 km de Dakar). Longtemps isolée des principaux axes routiers, elle a été désenclavée en 1998 par la construction d'une route nationale la reliant au reste du réseau routier. Dans cette région, les espèces natives, en particulier *Mastomys natalensis*, demeurent toujours majoritaires. Des populations de rats noirs récemment établies sont jusqu'à présent numériquement marginales et leur distribution se limite à certains quartiers du centre de la ville de Kédougou (Granjon et al., données non publiées). Dans ce contexte, il nous paraît donc pertinent de tirer avantage de cette séparation géographique dans la distribution des espèces commensales de rongeurs (invasifs *versus* natifs) dans un même pays (le Sénégal). Cette situation apparaît privilégiée pour une comparaison de la diversité génétique de *T. gondii* entre les zones portuaires où les rongeurs invasifs ont supplanté les espèces natives et une région à l'intérieur des terres où les rongeurs natifs restent majoritaires.



Figure 8 : Sénégal

Source : www.drivingdirectionsandmaps.com

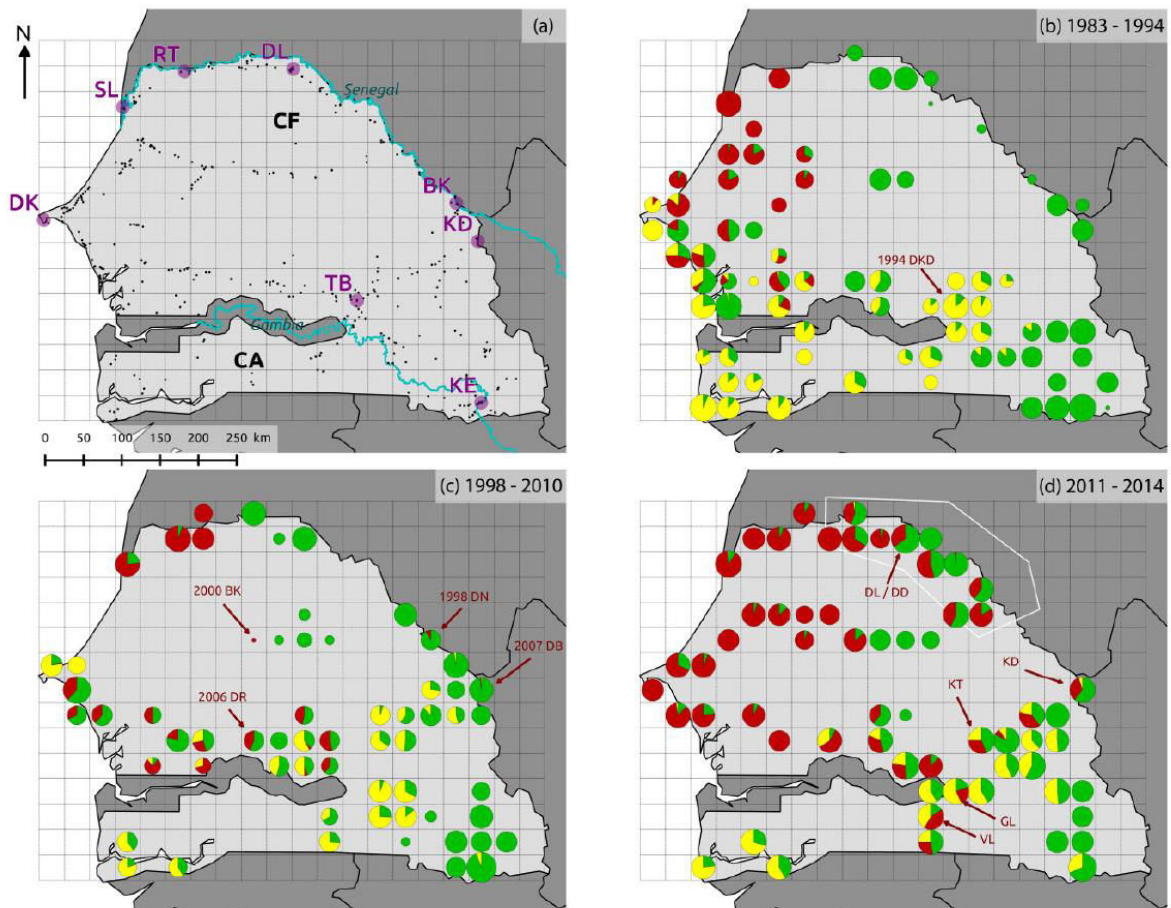


Figure 9 : Évolution des assemblages d'espèces de petits mammifères commensaux au Sénégal entre 1983 et 2014.

Cartes géographiques des localités échantillonnées (a) et de la répartition des captures de petits mammifères commensaux à travers le Sénégal, au cours de trois périodes d'échantillonnage : 1983-1994 (b), 1998-2010 (c) et 2011-2014 (d). Les diagrammes circulaires indiquent les proportions de petits mammifères piégés qui ont été identifiés, avec en rouge les individus appartenant à l'espèce *M. m. domesticus*, en jaune ceux appartenant au genre *Rattus* spp et en vert les individus appartenant à des espèces de rongeurs et de musaraignes natives.

Source: Dalecky et al., 2015

Cette comparaison nous permettra d'apporter des éléments de réponse à plusieurs questions :

- Est-ce que les invasions de rongeurs permettent l'introduction et la dissémination de souches depuis leur milieu d'origine dans les régions envahies ?
- Est-ce que les rongeurs invasifs, après établissement dans une zone envahie, peuvent devenir des réservoirs compétents des souches autochtones de *T. gondii* ?

- Est-ce que les rongeurs invasifs, après établissement dans une zone envahie, peuvent modifier la structure des populations de *T. gondii* au niveau de cette zone en contribuant à la sélection de certaines souches de *T. gondii* au détriment d'autres souches ?

Dans le chapitre 2, nous avons réalisé une revue de la littérature portant sur la diversité génotypique des souches de *T. gondii* en Afrique. L'objectif de cette revue était d'apporter une vision plus claire sur la diversité des souches de ce parasite à travers ce continent et sur leur distribution géographique. Elle servira donc de référence afin de pouvoir situer les données génotypiques issues de notre travail de terrain au Sénégal par rapport aux données disponibles pour le reste de l'Afrique.

Dans le chapitre 3, nous avons tiré avantage de plusieurs campagnes de captures de rongeurs menées entre septembre 2015 et septembre 2016 dans les villes côtières de Dakar, Rufisque et Joal-Fadiouth par nos collaborateurs du Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP). Dans ces 3 localités, la souris domestique était de loin l'espèce la plus abondante, suivie du rat noir et de deux espèces natives : le rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*) et une crocidure (*Crocidura olivieri*). Un des objectifs de ce travail était d'identifier les souches de *T. gondii* qui circulent dans ces localités côtières et surtout de déterminer si les espèces natives et invasives de rongeurs sont les réservoirs des mêmes lignées de *T. gondii* ou bien de lignées différentes.

Dans le chapitre 4, nous nous sommes attachés à comparer la diversité des souches de *T. gondii* qui circulent chez la faune domestique dans les villes côtières de Saint-Louis et de Dakar où la souris domestique est l'espèce commensale prédominante, avec celles qui circulent dans la région de Kédougou à l'intérieur des terres, là où *Mastomys natalensis* est l'espèce commensale la plus abondante. L'objectif de ce travail est d'évaluer dans quelle mesure et par quels mécanismes (importation de nouvelles souches ou sélection de souches particulières ou les deux) les rongeurs invasifs ont pu modifier la diversité originelle du parasite dans ce pays.

Chapitre II. Diversité génétique de *Toxoplasma gondii* en Afrique : revue de la littérature

II.1. Introduction

La première souche isolée en 1908 par Charles Nicole en Tunisie provenait d'un rongeur sauvage, le *Ctenodactylus gondii*; c'était donc une souche africaine. Elle s'est révélée virulente pour les souris de laboratoire, qui ont développé des quantités importantes d'ascite riche en tachyzoïtes avant de succomber à l'infection (Laveran et Mullaraz, 1913; Moulin, 1993). Les nombreuses souches humaines ou animales isolées chez la souris de laboratoire par la suite montraient des expressions phénotypiques très différentes : certaines étaient avirulentes alors que d'autres conduisaient à une toxoplasmose fatale en modèle murin. La caractérisation phénotypique est longtemps restée l'unique moyen de décrire la diversité des souches de *T. gondii*, avant l'avènement de l'ère de la caractérisation génétique, qui s'est développée à partir du début des années 90. En 2012, Su et collaborateurs ont publié une étude de référence sur la diversité mondiale de *T. gondii* où 950 souches ont été caractérisées par l'analyse de différents types de marqueurs (microsatellites, RFLP et introns). Une publication plus récente (Lorenzi et al., 2016) s'est également intéressée à la diversité globale des souches de *T. gondii*, mais s'est, cette fois-ci, basée sur le séquençage complet du génome de 62 souches du parasite représentatives de la diversité globale de l'espèce connue à ce jour. En revanche, le peu de souches asiatiques et africaines analysées dans ces deux publications reflétait bien le manque de données disponibles concernant la diversité génétique pour ces 2 continents en milieu domestique (Shwab et al., 2014), et de façon plus marquée encore en milieu sauvage. Une revue récente sur la diversité génétique de *T. gondii* en Asie publiée par notre équipe a montré la prédominance de la lignée *Chinese 1/ToxoDB#9* (haplogroupe 13) en Chine, mais a aussi permis de mettre en évidence l'existence de larges zones du continent encore inexplorées (Chaichan et al., 2017). En Afrique, les premières études de diversité génétique ont identifié en majorité des souches de type II et III dans plusieurs pays différents (Dubey et al., 2003b, 2005; Velmurugan et al., 2008a). Comme ces deux lignées clonales sont également majoritaires en Europe et en Amérique du Nord, ces observations ont conduit à conclure que ces 3 continents partageaient une diversité similaire. En 2010, Mercier et collaborateurs ont montré la circulation de lignées non-archétypales appartenant aux lignées *Africa 1* et *Africa 3* (haplogroupes 6 et 14, respectivement) en milieu domestique au Gabon, un résultat qui mettait en perspective le fait que la question de la diversité génétique de *T. gondii* en Afrique était loin d'être définitivement résolue. En outre, des souches appartenant à la lignée *Africa 1*, majoritaire de *T. gondii* en Afrique de l'Ouest et centrale, avaient également été identifiées en Amérique du Sud (Khan et al., 2007; Pena et al., 2008) et en particulier au Brésil (sous l'appellation *BrI*). Dans ce continent, la toxoplasmose, surtout sous sa forme oculaire, y est beaucoup plus fréquente et sévère qu'en Europe (Glasner et al., 1992; Gilbert et al., 2008; de-la-Torre et al., 2013; Torgerson and Mastroiacovo, 2013). Ces liens justifient donc de s'intéresser à la diversité génétique de *T. gondii* en Afrique et d'explorer l'existence de liens possibles entre les souches qui circulent dans ce continent et la sévérité de l'infection chez l'homme.

Dans le cadre d'une revue de la littérature, nous avons synthétisé les connaissances liées à la diversité génétique de *T. gondii* en Afrique. Nous nous sommes intéressés à la structure

spatiale de cette diversité génétique dans ce continent, ses déterminants et ses conséquences épidémiologiques. Cette revue a donné lieu à la publication suivante :

II.2. Article 1 : Galal L, Ajzenberg D, Hamidović A, Durieux MF, Dardé ML, Mercier A. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends in Parasitology*. 2018 Feb;34(2):140-154.

***Toxoplasma* and Africa: one parasite, two opposite population structures**

Lokman Galal ^a, Daniel Ajzenberg ^a, Azra Hamidović ^a, Marie-Fleur Durieux ^c, Marie-Laure Dardé ^{a,b}, Aurélien Mercier ^{a,*}

^a INSERM UMR_S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges 87025, France

^b Centre National de Référence Toxoplasmose/Toxoplasma Biological Resource Center, CHU Limoges, 87042 Limoges, France

^c Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Limoges, 87042 Limoges, France

*Correspondence: aurelien.mercier@unilim.fr (A. Mercier)

Key words: *Toxoplasma gondii*; genetic diversity; population structure; Africa

Abstract

Exploring the genetic diversity of *Toxoplasma gondii* is essential in understanding its worldwide distribution and the determinants of its evolution. Africa remains one of the least studied areas of the world regarding *T. gondii* genetic diversity. This review has compiled published data on *T. gondii* strains from Africa to generate a comprehensive map of their continent-wide geographical distribution. The emerging picture about *T. gondii* strain distribution in Africa suggests a geographical separation of the parasite populations across the continent. We discuss the potential role of a number of factors in shaping this structure. We finally suggest the next steps towards a better understanding of *Toxoplasma* epidemiology in Africa in light of the strains circulating on this continent.

Africa: the missing link in the structure of *Toxoplasma gondii* populations worldwide

The protozoan *Toxoplasma gondii* is a ubiquitous and highly prevalent parasite that can theoretically infect all warm-blooded vertebrates. The *Toxoplasma gondii* life cycle is complex as it can involve a vast range of potential hosts and several transmission pathways (Figure 1). In humans, toxoplasmosis causes infections in immunodeficient or immunocompetent patients, congenital toxoplasmosis and ocular lesions. These manifestations have different degrees of severity and incidence rates [1]. It is generally accepted that many factors potentially underlie the severity and clinical heterogeneity of toxoplasmosis, such as the mode of contamination, the inoculum dose, repeated *T. gondii* infections, age, ethnic variation, immune status, screening system, occurrence of coinfections, and the **genotypes** of the *T. gondii* strains involved. A growing body of evidence supports the notion that the *T. gondii* genotype may be associated with disease severity [1-3].

In North America and Europe, *T. gondii* populations showed a clonal structure, in which the majority of *T. gondii* strains could be grouped into three highly successful **clonal lineages** (see Glossary) named types I, II and III [4]. Today, it appears that type II and, to a lesser extent, type III clonal lineages predominate in Europe [5]. The same structure was described in North America but recent studies showed a non-negligible prevalence of type 12 on this continent [6], mainly among wild animals. Conversely, a substantial diversity was found in South America [7], which could likely be the origin of modern *T. gondii* strains [8]. Many of these South American strains showed **virulence** in mouse bioassays [9, 10] and a higher

pathogenicity in immunocompetent humans as reported in Brazil, Colombia, and French Guiana [11-13].

Recent work suggested that the majority of *T. gondii* strains could be grouped into 16 **haplogroups**, belonging to six major **clades** [14-16]. A major limitation to these studies is the occurrence of sampling gaps in Asia [reviewed in 14] and Africa.

For Africa, a global picture of the *T. gondii* population structure is still lacking. The sparse data and reports of human toxoplasmosis still raise the question of the real burden of this disease among populations from this continent. A better knowledge of the *T. gondii* genetic diversity and population structures in Africa could be of real importance to address the issue of toxoplasmosis burden. This review is the first comprehensive mapping of African *T. gondii* strains, revealing the continent-wide geographical distribution of these strains.

Genotyping of African strains

During the last fifteen years, 614 **isolates** from Africa have been typed with different techniques (Table 1). Throughout this period, the progressive discovery of the complex structure of worldwide *T. gondii* genetic diversity encouraged the development of more resolute genotyping techniques. Typing based on a single genomic **locus** was widely used in early studies but has major limitations for reliable **strain** characterization. Unfortunately, a number of recent studies from Africa continue to use this approach although it is clearly outdated. The majority of studies reported genotyping results of 5 to 15 **markers** from two different multilocus techniques used on a routine basis in several laboratories: PCR-**RFLP** and **microsatellite** (MS) analysis. These two genotyping techniques have different strain designations. For strains defined by RFLP, a specific numeral is attributed to each different genotype according to the codification adopted by the **ToxoDB** naming system (<http://toxodb.org/toxo/>). In strains characterized by MS, designations referring to the geographic origin are attributed to clonal lineages (e.g. *Chinese 1*, *Africa 3*). Other genotypes are defined as unique, single or atypical strains. Except for predominant lineages and some unique strains, equivalence between RFLP-defined genotypes and MS-defined genotypes is still unclear [17]. Standardization of typing methods will facilitate the integration of genetic data from different studies for population genetics analysis. In a landmark study about *T. gondii* global diversity [14], both techniques were used for strain typing and the equivalence between 138 globally distributed strains previously genotyped by either multilocus MS or multilocus RFLP was established. In addition to these techniques, whole genome sequencing (WGS) is gaining popularity due to its continuously decreasing cost. However, WGS is still technically cumbersome for routine strain typing. A number of isolates from Africa were subjected to whole genome sequencing including a strain from Uganda [18] and 6 strains from Gabon [16]. These two studies showed that WGS appears to be the most appropriate sequencing approach for fine analysis of genomic admixture patterns. It clearly represents the future regarding studies dealing with the evolutionary history of *T. gondii* and its population structure.

Sampling of *T. gondii* strains from Africa

The available *T. gondii* samples are still unlikely to be representative of the *T. gondii* genetic diversity in Africa. *T. gondii* circulates among wild animals in Africa [19], but all the isolates obtained to date were sampled from humans and domestic animals. Strains that circulate in sylvatic cycles in Africa are still unknown. Moreover, sampling disparities exist between regions of Africa and vast areas remain unexplored: very little genetic data is available for the Sahelian belt and Southern Africa is a huge gap in terms of sampling efforts (Figure 2).

Within countries, sampling representability was not targeted and isolates from the different countries were obtained from a single location in a significant number of studies. In humans, 18 *T. gondii* strains were isolated from immunocompromised patients of African origin hospitalized in France and represent the only data published in English about *T. gondii* genetic diversity for 6 different African countries and one French overseas department in Africa [20]. Furthermore, 40 *T. gondii* genotypes from human cases of toxoplasmosis from 12 African countries and 2 French overseas departments (Mayotte and Reunion Island) hospitalized in France were published in French by the French National Reference Center for toxoplasmosis (http://cnrttoxoplasnose.chu-reims.fr/?page_id=224). For a majority of these human cases (n=25), infection was presumed to have originated in Africa because the patients were born or had recently travelled to Africa. Furthermore, the identified strains belonged to clonal non-archetypal African lineages or were atypical strains never identified among European residents. Archetypal genotypes common in Europe such as type II and III identified in a number of these patients (n=15) were also taken into account when strong evidence of infection in Africa was assessed.

***T. gondii* genetic diversity in Africa**

Initial genotyping techniques for *T. gondii* strains were developed based on the assumption that all genotypes could be grouped into one of the three clonal lineages identified at that time (I, II and III), with rare exceptions [4]. It is now acknowledged that genotyping based on a single locus analysis is an outdated approach, as it can differentiate between the three archetypal lineages for a single locus. Therefore, it is uninformative if the strain of interest is a recombinant strain or belongs to another clonal lineage. Numerous African isolates were genotyped this way [21-26] and should be retyped by a multilocus technique. Fixing a minimal number of loci for multilocus genotyping is a tricky decision to make, but experience over the years has shown that increasing the number of markers limits the risk of strain misidentification. Genotyping results obtained with the current multilocus MS or RFLP techniques seem to match results obtained by highly resolutive techniques such as MLST [14, 27] or WGS [16], suggesting that those widely-used techniques succeed in broadly capturing the allelic composition of most strains. In this review, we have included genotyping results of 372 African strains based on the analysis of at least 5 markers (Table 2).

Archetypal lineages in Africa (Type II and type III)

Among the three well-known archetypal lineages types I, II and III, only the latter two have been identified in Africa. Type II and type III are the main lineages in vast regions of the world, including the Middle East, Europe and North America. They are avirulent for outbred mice and weakly pathogenic in immunocompetent humans [1]. In Africa, both lineages are widely distributed. Type II is the predominant lineage in North and East Africa and appears to be more marginal in West and Central Africa. For type III, available sampling still does not allow to draw conclusions about differences in the prevalence of this lineage between regions of Africa.

Non-archetypal clonal lineages in Africa

Africa 1 (haplogroup 6) is a highly prevalent mouse-virulent clonal lineage in both West and Central Africa defined with MS markers [20, 28] (Figure 3). Interestingly, strains of this lineage were not reported among 236 isolates from North and East Africa but the presence of the *Africa 1* lineage was recently described in two cases of congenital toxoplasmosis in Turkey [29]. The unique exception to this is a single *Africa 1* strain isolated [20] in Uganda, a

country with an intermediate geographical position between Central and Eastern Africa. Moreover, *Africa 1* strains show a high degree of genetic similarity with a number of strains from Brazil, among them Brl lineage, all belonging to haplogroup 6 [14]. Recently, genomic admixture analysis relying on the **chromosome painting** technique has demonstrated a high degree of similarity between *Africa 1* lineage and type I strains [16].

Africa 3 (haplogroup 14) is another mouse-virulent clonal lineage defined with MS markers which was isolated in different areas of Gabon [28]. Its genomic admixture pattern [16], together with its geographical location, suggest that this lineage might have emerged after two or more recombination events between *Africa 1*, type II and type III strains. Notably, strains belonging to haplogroup 14 are also present in South America.

ToxoDB#20 is a RFLP genotype repeatedly identified in Egypt [30, 31] and Ethiopia [32]. Strains with this genotype were also isolated in Sri Lanka [33] and in the United Arab Emirates [34]. Compiled data about this genotype suggests that it could represent a lineage prevailing in both Asia and Africa. By RFLP marker analysis, this genotype shared 10 out of 11 alleles with Chinese 1 (ToxoDB#9), the predominant lineage in China among domestic animals, but also to the Ghanaian strain *TgCkGh01* (ToxoDB#137 - unique RFLP genotype). *Chinese 1* and the Ghanaian *TgCkGh01* were classified as belonging to haplogroup 13 [14]. Assigning ToxoDB#20 to haplogroup 13 should be confirmed by more resolutive genotyping methods such as **MLST**. By MS genotyping, *TgCkGh01* and two strains from Mali and Gambia were found to be related as they shared identical alleles for 5 typing markers (http://cnrtoxoplasmosis.chu-reims.fr/?page_id=224). Although weakly prevalent, haplogroup 13 seems to be widely distributed in Africa (except in Central Africa), consolidating genetic links between *T. gondii* populations of Asia and Africa as it was previously suggested by Chaichan [17].

Overall, it seems that 5 main haplogroups prevail in the sampled regions of Africa and strains belonging to these haplogroups represent 94% of the African isolates to date. It therefore appears that *T. gondii* genetic diversity in the domestic environment has a mainly clonal structure in Africa.

Atypical or unique strains

In addition to what was discussed above, 23 strains with rarer genetic makeup were identified among African isolates. Most of these strains were however close to the predominant lineages occurring in Africa. In West and Central Africa, most non-clonal strains were close to *Africa 1*, *Africa 3* or type III and might therefore be recombinant of these highly prevalent lineages or could have a common ancestral origin. In Ethiopia, a mouse-virulent atypical strain was described in the isolated region of Oromia at a high altitude [35]. This strain might have a distinct ancestral origin within the known diversity of *T. gondii* as it appears to be highly divergent at both genotypic and allelic levels.

Two opposite *T. gondii* population structures in Africa

Presence of *T. gondii* in Africa could be related to the initial spread of *T. gondii* from the Americas to Asia via the Bering Strait, before entering Africa around 1.5 My ago [8]. Today, the spatial distribution of the available genotypes over the African continent suggests a quite clear demarcation of *T. gondii* populations between the desert and semi-arid zones of North and East Africa on the one hand and the tropical zone in West and Central Africa on the other hand (Figure 3). The determinants of this spatial structure are unknown but may be related to differences in historical and bioenvironmental features between these two main

regions of Africa. A possible South American origin of *T. gondii* current genetic diversity in Africa is supported by the genetic similarities between strains found in African tropical countries and a number of strains from South America, all belonging to clade A [14, 16]. However, clade A strains are almost absent in North and East Africa, which are largely dominated by type II lineage, followed by type III. These two highly successful lineages are supposed to have emerged about 10,000 years ago, along with the birth of agriculture in the fertile crescent region in the Middle-East [36]. Northeast Africa shares a long common history with the Asian part of the Middle-East. Moreover, cats have a long established tradition in countries like Egypt and Ethiopia [37-39], dating back to the very beginning of domestication. We hypothesize that the development of trans-Saharan trade [40] and the pre-existent nomadic pastoralism [41] might have played a role in disseminating these lineages in the Sahara and Sahel regions of Africa, supplanting the original genetic diversity in these regions. Before the early modern period and the intensification of global maritime trade, North and East Africa were linked to Europe and Asia through privileged trade exchanges during the successive historical periods (Roman Empire, Arab trade, the Silk road, etc.).

In contrast, the tropical zone of Africa remained hostile and hardly accessible to human traffic or **transhumance** before the colonial period. The Saharan desert, since the onset of the climatic desiccation of Northern Africa about 6000 years ago [42], and the typical dense forest cover in tropical areas could have acted as topographical obstacles for human exchanges [43]. Moreover, the presence of several endemic diseases for humans (onchocerciasis, malaria etc.) and livestock (trypanosomiasis) led to the selection of very specific adaptive traits for survival such as sickle cell allele for malaria resistance [44] and livestock trypanotolerance [45, 46]. Therefore, we propose that the isolation of the tropical zone in Africa and its bioenvironmental specificities impeded the gradual homogenization of the parasite's populations. In fact, highly successful archetypal lineages may have appeared in North and East Africa due to the intense circulation of parasite's hosts over the years. The tropical zone of Africa could therefore be a refuge zone for an older diversity of *T. gondii* on this continent. Given that *T. gondii* circulates among African wild animals [19], obtaining isolates from wildlife in Africa may help determine if clade A strains found in the domestic environment of the tropical zone have a wild genetic background. If this link is established, it will confirm the ancestral or pre-domestication occurrence of clade A strains on this continent.

Current climatic changes, vegetation clearing, progress in treatment and vector control may partly be lifting these barriers. The intensification of global trade and human migrations over the last centuries could also drive crucial evolutionary changes in the *T. gondii* population structure [47]. In line with this idea, a potential role of the transatlantic slave trade has also been evoked in order to explain the presence of *Africa 1* strains in South America (designated as Brl lineage in Brazil) [28, 47].

Another open issue is the possible role of the genetic composition of strains in shaping these contrasting population structures. For example, the allelic diversity of the *ROP18* gene, known to be a major mediator of virulence in laboratory mice, was proposed to confer selective advantages for transmission in specific ecological niches (host species or certain strains of host species) [48]. *Toxoplasma gondii* strains with the type I allele of *ROP18* lead to lethal infection in all conventional strains of laboratory mice [49]. However, mice (*Mus musculus*) found in the wild probably have different resistances to infection by strains holding the type I allele of *ROP18*, as suggested by the great polymorphism in genes involved in innate immune response to *T. gondii* [50]. Moreover, other host species, like rats [51] and American deer mice (*Peromyscus*) [52] have been shown to resist infection with lethal strains

for laboratory mice. The type I allele of ROP18 is shared by the vast majority of South American *T. gondii* strains and Clade A African strains (*Africa 1*) [48]. Strains harbouring this allele could have a selective advantage in promoting transmission in more resistant natural hosts [48, 53] by leading to chronic infection instead of killing their host. A more comprehensive knowledge of natural hosts resistance to virulent *T. gondii* will be necessary to decipher the role of host-parasite interactions in shaping current *T. gondii* population structures. Then the next step will be to investigate the occurrence of a possible geographical association between resistant hosts and virulent *T. gondii* strains.

Worldwide, strains circulating in tropical areas appear to have a heightened mouse-virulence compared to other strains [48, 49, 54]. In South America, the occurrence of highly pathogenic strains for humans is well established today [11, 55, 56], but this tendency is less clear in other tropical regions of the world such as Asia or Africa.

Clinical toxoplasmosis in Africa

The complexity of diagnosing clinical toxoplasmosis makes obtaining human strains challenging, especially in hospital facilities of Africa, where basic diagnostic means are often lacking. *Toxoplasma gondii* DNA or strain can only be isolated in symptomatic patients, from invasive sampling such as cerebro-spinal fluid or brain biopsy, broncho-alveolar lavage or blood in immunosuppressed patients, aqueous humor from ocular anterior chamber in case of ocular toxoplasmosis, amniotic fluid or placenta in case of congenital toxoplasmosis [57]. For congenital situation, a seroconversion in pregnant women should have been detected previously, which can be done only by systematic serological screening of pregnant women (infrequent in the context of African countries). When performed, this direct diagnosis is mainly based on parasitic DNA detection, and the quantity of DNA is often too low to allow a direct genotyping [58]. Obtaining isolates from immunocompetent patients with severe systemic or ocular toxoplasmosis is however the only way to evaluate the virulence of *T. gondii* strains in humans, as shown in South America [56, 59]. Serological investigations demonstrate that *T. gondii* infection frequently occurs in Africa. Prevalence of human infection with *T. gondii* ranges from 7% in Zambia [60] to 84% in Madagascar [61], although the results are not always comparable due to differences in diagnostic techniques and investigated populations (general population, women of childbearing age or pregnant women, HIV-infected patients). It is recognized that people with HIV infection have a very high burden of *T. gondii* infection, but recent estimates suggest that this burden is particularly high in sub-Saharan Africa [62]. However, the involvement of *T. gondii* genotype determinants remains unclear [20]. A high burden of congenital toxoplasmosis has been estimated to occur in Africa [63] although case reports of this condition are extremely rare. In the few exploitable indirect studies determining the occurrence of active ocular toxoplasmosis among immunocompetent patients, human samples were analysed in Europe [64] or were collected from African migrants in Europe [65]; a high prevalence of this clinical form was reported. Notably, Gilbert et al. [65] showed that among people of West African origin in Great Britain, the incidence of ocular toxoplasmosis was 10 fold higher in people born in West Africa compared with people born in Great Britain. This result suggests a possible role of the parasite genotype, not forgetting that other factors such as inoculum dose or life cycle stage could be involved. A high incidence of ocular toxoplasmosis is reported in South America [12, 13]. Involvement of strains from clade A, occurring in both South America and West Africa [14], on the incidence of ocular forms among West African patients remains unknown. Regarding other symptomatic forms in immunocompetent patients, very few reports are available. Interestingly, early prospective studies in Africa [66,

67] reported severe systemic cases of the disease in several areas of Central Africa (Central African Republic and Congo). Confirmed diagnosis was obtained by bioassay on laboratory mice and/or guinea pigs. However, no data was reported concerning their immune status and HIV was unknown at that time. More recently, an Italian case report described an unusual case of acute acquired toxoplasmosis with recurrent seizures in an immunocompetent European individual with a history of travelling to Ethiopia [68]. No isolate was recovered from the patient, but it is noteworthy that highly atypical strains are circulating in this country [35] and could be associated with the incidence of such atypical clinical forms. In these cases of severe toxoplasmosis from Africa, the clinical presentation often includes fever and/or neurological symptoms. In Africa, it is likely that the diagnosis of toxoplasmosis will not be evoked in patients with nonspecific infectious syndromes or neurological symptoms and other more common diseases like malaria will be suspected [69, 70]. It appears in fact that malaria is generally overdiagnosed. The wide uncertainty intervals of malaria incidence estimates give insight into the lack of accurate data concerning the diagnostic reliability among the reported cases [71]. Since the late 1990s, toxoplasmosis has been more frequently diagnosed in French Guiana in febrile immunocompetent patients (usually associated with multiorgan failure and pulmonary involvement) as practitioners from this French overseas department are well-informed of the occurrence of severe forms of the disease in this area of the world [11, 55, 56]. Collectively, the few studies from Africa suggest that various clinical forms of toxoplasmosis are occurring on this continent but seem to be under-diagnosed, maybe due to the lack of diagnostic means and awareness of this disease.

Concluding remarks and future perspectives

This review has compiled data regarding the known distribution of *T. gondii* strains across Africa. The emerging global picture concerning *T. gondii* strain distribution in Africa suggests the occurrence of a geographical separation of the parasite populations across the continent. The distribution of non-archetypal lineages of clade A seems to be restricted to the tropical zone of Africa. The geographical isolation and different ecology which characterize the tropical zone could provide elements of explanation to this contrasting spatial structure. Moving forward, studying the role of different bioclimatic factors in shaping *T. gondii* population structure will likely help in deciphering the recent *T. gondii* evolutionary history. Based on the evaluation of the available literature, with its limitations, it is clear that addressing the issue of human toxoplasmosis in Africa deserves further research. Africa shares common *T. gondii* haplogroups with South America, the continent with the highest morbidity burden caused by ocular toxoplasmosis. At the present time, epidemiological studies estimating the prevalence of ocular toxoplasmosis in general populations appear to be a convenient starting-point to assess the real burden of the disease on this continent. Because of the available sampling, a possible heightened virulence of African *T. gondii* strains for humans is still an unsolved issue (see Outstanding questions). Developing highly resolutive and specific non-invasive typing techniques such as serotyping would be a milestone in overcoming the current limitations in the evaluation of the genotype role in the infection severity [72]. Moreover, recent progress is being made in the development of innovative tools like rapid tests adapted to the context of developing countries for a reliable diagnosis of the main infectious diseases such as malaria. Therefore, it is reasonable to predict that the diagnosis of non-malarial febrile illnesses will increase in the next years, facilitating the study of diseases such as toxoplasmosis in Africa.

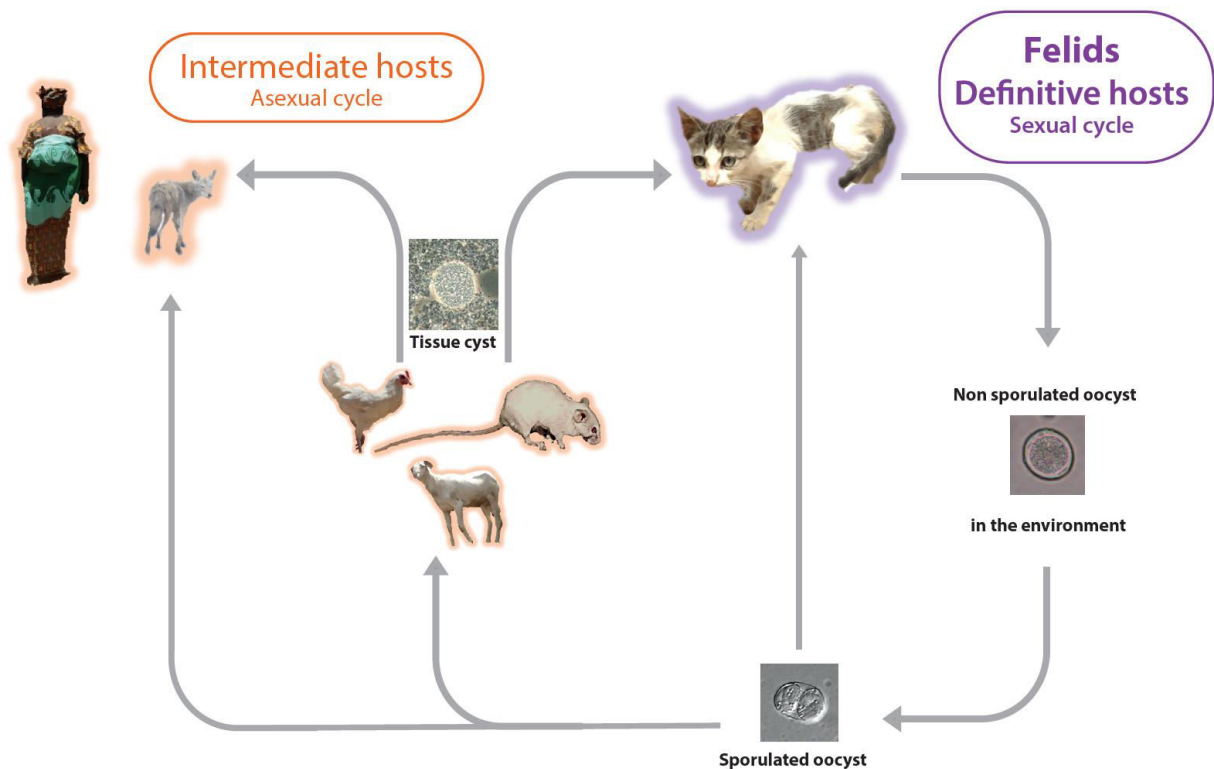


Figure 1. Life cycle of *Toxoplasma gondii*

Mammals and birds, the intermediate hosts, develop dormant tissue cysts after ingestion of oocysts shed in the environment by felids, the parasite's final hosts. *Toxoplasma gondii* infection can be transmitted between intermediate hosts by oral transmission through predation or scavenging behaviours. However, felids play a major role in maintaining the parasite in the environment, by shedding millions of resistant oocysts through their faeces after primary infection. In humans, pregnancy is the most critical period for *T. gondii* infection, as it may cause congenital toxoplasmosis, a condition that can lead to severe ocular and brain damage.

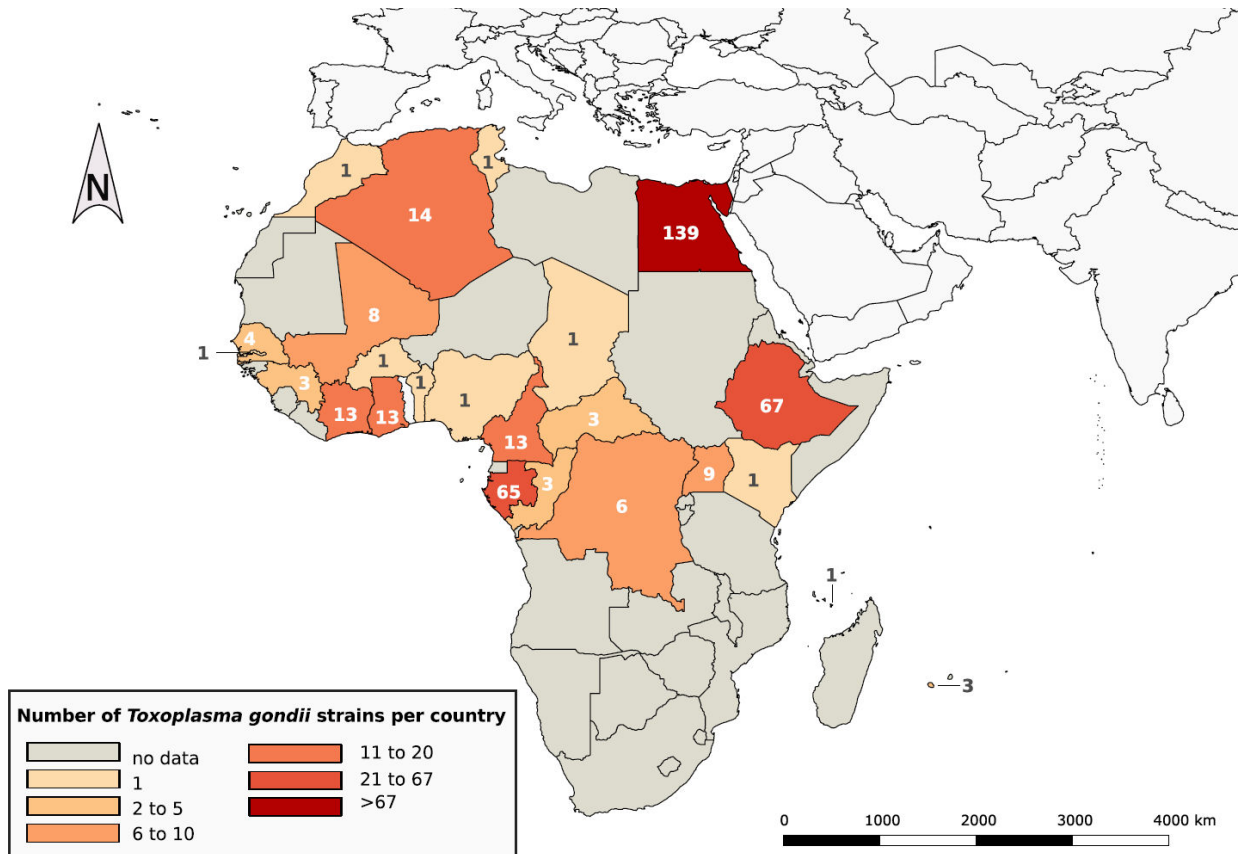


Figure 2. Total number of *Toxoplasma gondii* strains reported for each African country.

Only strains genotyped using 5 markers or more were included. A colour was attributed to each category of values, with the colour intensity positively correlated to the number of strains in each category. Categories were establishing using the Jenks natural breaks classification method.

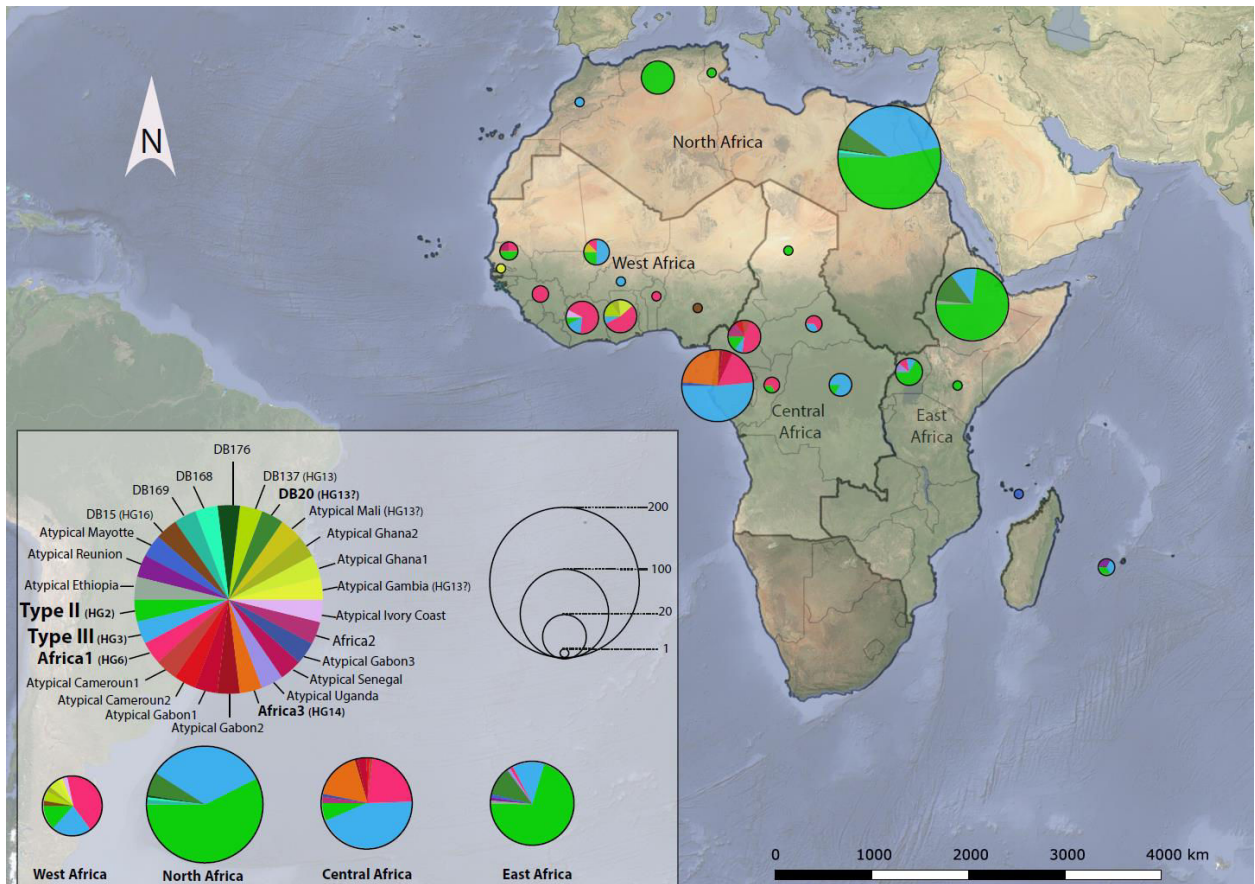


Figure 3. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* strains in Africa. Sizes of pie charts correlate with total number of isolates for each country, and colours indicate different genotypes. Known clonal lineages designations appear in the legend in bold lettering.

Table 1. Comparison of the genotyping methods used for *Toxoplasma gondii* strains from Africa

Type of analysis	Number of loci	Advantages	Limits	Technique references
Unilocus PCR-RFLP	unique	simple and cost effective	unrepresentative of the genome : does not capture the complexity of allelic combinations leading to high risk of strain misidentification => outdated technique not suitable for typing	[73-75]
Multilocus PCR-RFLP (n-PCR-RFLP)	5	– useful for clonal lineages versus atypical strains distinction	– relies on nested PCR that needs additional caution during manipulation to avoid DNA contamination – no intra-type distinction – low sensitivity (estimated at ≥ 100 <i>T. gondii</i> genome equivalents per PCR) - risk of strain misidentification due to a limited number of markers	[76, 77]
Multilocus PCR-RFLP (n-PCR-RFLP)	9	– useful for clonal lineages versus atypical strains distinction – well defined designation scheme for atypical or unique strains	– relies on nested PCR that need additional caution during manipulation to avoid DNA contamination – no intra-type distinction – low sensitivity (estimated at ≥ 100 <i>T. gondii</i> genome equivalents per PCR)	[78]
Multiplex multilocus PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP)	10	– high sensitivity (estimated at ≥ 10 <i>T. gondii</i> genome equivalents per PCR) – useful for clonal lineages versus atypical strains distinction – well defined designation scheme for atypical or unique strains	– relies on nested PCR that need additional caution during manipulation to avoid DNA contamination – need two successive PCR runs (initial step of multiplex PCR amplification) – poor intra-type distinction	[79, 80]
Multiplex PCR of microsatellite markers	5 or 6	– high discrimination power= useful for clonal lineages versus atypical strains distinction and intra-type distinction	– low sensitivity (estimated to be between 50 to 100 <i>T. gondii</i> genome equivalents per PCR) – no definite designation scheme for atypical or unique strains - risk of strain misidentification due to a limited number of markers	[20, 81, 82]
Multiplex PCR of microsatellite markers	13 or 15	– high discrimination power – useful for clonal lineages versus atypical strains distinction and intra-type distinction – distinction between natural type I strain and RH strain (PCR positive control) in case of contamination suspicion	– low sensitivity (estimated to be between 50 to 100 <i>T. gondii</i> genome equivalents per PCR) – homoplasmy in highly polymorphic fingerprint markers – no definite designation scheme for atypical or unique strains	[28, 83]
Unilocus sequence typing	unique	– simple and cost effective – high sensitivity	unrepresentative of the genome to capture the complexity of allelic combinations leading to high risk of strain misidentification => not suitable for typing	[84-86]
Whole Genome Sequencing	whole genome	– very high discrimination power – precise identification of recombination/admixture patterns	– expensive (although the cost is rapidly dropping) – cumbersome and lengthy for routine use – still only used for fine genomic exploration (identification of specific genes or recombination patterns) rather than routine strain characterization	[16, 18]

Table 2. *Toxoplasma gondii* genotypes from Africa

Location(s)	Specie(s)	Number of strains	Genotyping method	ToxoDB# or MS genotypes	References
ALGERIA					
	Human	2	Multiplex PCR of 15 MS markers	2 type II	(http://cnrttoxoplasnose.chu-reims.fr/?page_id=224)
Algiers	Cats	12	Multiplex PCR of 15 MS markers	12 type II	[87]
BENIN					
	Human	1	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 Africa 1	[20]
BURKINA FASO					
	Free range chickens	1	Mn-PCR-RFLP 11 markers	1#2 (Type III)	[88]
CAMEROUN					
	Human	5	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 type II 2 Africa 1 1 Atypical strain 1 Atypical strain	[20]
	Human	8	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 type II 1 type III 4 Africa 1 1 Atypical strain 1 Atypical strain	(http://cnrttoxoplasnose.chu-reims.fr/?page_id=224)
CENTRAL AFRICAN REPUBLIC					
	Human	1	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 type III	[20]
	Human	2	15 Multiplex PCR of MS markers	1 type III 1 Africa 1	(http://cnrttoxoplasnose.chu-reims.fr/?page_id=224)
CONGO					
	Human	3	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 type II 2 Africa 1	(http://cnrttoxoplasnose.chu-reims.fr/?page_id=224)
COTE D'IVOIRE					
	Human	4	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 type III 2 Africa 1 1 Atypical strain	[20]
	Human	9	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 type II 1 type III 7 Africa 1	(http://cnrttoxoplasnose.chu-reims.fr/?page_id=224)
Democratic Republic Of Congo					
Kinshasa	Free range chickens	5	Mn-PCR-RFLP 11 markers	1#1 (Type II) 4#2 (Type III)	[88](Velmurugan et al., 2008b)
	Human	1	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 type III	[20]
EGYPT					
El-Bihera Governorate, Menofia Governorate	Free range chickens	7	Mn-PCR-RFLP 11 markers	2#1 (Type II)	[88]
Giza Governorate	Stray dogs	21	Mn-PCR-RFLP 11 markers	5#2 (Type III) 11#3 (Type II) 4#2 (Type III) 6#20 (HG13?) 1 mixed infection	[31]
Giza Governorate	Feral cats	111		61#1 (Type II) 42#2 4#20 1#168	[30]

				2#169 1#176 (#20-like (HG13?) 4 mixed infections	
ETHIOPIA					
Addis Ababa	Backyard chickens	1	Mn-PCR-RFLP 11 markers	1#1 (Type II)	[89]
Addis Ababa	Feral cats	33	Mn-PCR-RFLP 11 markers	9#1 (Type II) 10#3 (Type II) 5#2 (Type III) 9#20 (HG13?)	[32]
Oromia region	Goats	15	Multiplex PCR of 15 MS markers	13 type II 2 type III	[35]
	Sheep	18	Multiplex PCR of 15 MS markers	16 type II 1 type III 1 Atypical strain	
GABON					
Dienga, Libreville, Franceville, Makokou, La Lopé, Mougoundou, Bakoumba	Free range chickens and domestic animals	65	Multiplex PCR of 13 MS markers	34 type III 3 Atypical strains 1 Atypical strain 10 Africa 1 16 Africa 3 1 Atypical strain (Africa 3-like strain) 4 mixed infections	[28]
GAMBIA					
	Human	1	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 Atypical strain (HG13?)	(http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
GHANA					
Kumari	Free range chickens	2	Mn-PCR-RFLP 11 markers	1#132 (Type III) 1#137 (HG13)	[88]
Cape Coast	Human	1	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 Africa 1	[20, 90]
	Free range chickens	6	n-PCR-RFLP 10 markers	5#41 or #145 (Africa 1) no Toxo#DB number available (identical to TgCkBrRj2)	[58]
	Cats	3	n-PCR-RFLP 10 markers	1#41 or #145 (Africa 1) 2 Atypical strains	
	Human	1	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 Atypical strain (HG13)	(http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
GUINEA					
	Human	1	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 Africa 1	[20]
	Human	2	Multiplex PCR of 15 MS markers	2 Africa 1	(http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
KENYA					
Kisumu	Free range chickens	1	Mn-PCR-RFLP 11 markers	1#3 (Type II)	[88]
MALI					
	Free range chickens	4	Mn-PCR-RFLP 11 markers	1#3 (Type II) 3#2 (Type III)	[88]
	Human	4	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 type II 1 type III 1 Africa 1 1 Atypical strain (HG13)	(http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
MAYOTTE					
	Human	1	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 Atypical strain	(http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
MOROCCO					

	Human	1	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 type III	(http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
NIGERIA					
Vom, Plateau state	Free range chickens	1	Mn-PCR-RFLP 11 markers	1#15 (HG16)	[88]
REUNION ISLAND					
	Human	3	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 type II 1 type III 1 Atypical strain	(http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
SENEGAL					
	Human	2	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 Africa 1 1 Atypical strain	[20]
	Human	2	Multiplex PCR of 15 MS markers	2 type II	(http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
TCHAD					
	Human	1	Multiplex PCR of 15 MS markers	1 type II	(http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=224)
TUNISIA					
	Human	1	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 type II	[20]
UGANDA					
Kampala	Free range chickens	7	n-PCR-RFLP 5 markers	6#1 or #3 (Type II) 1#2 (Type III) 3 mixed infections	[91]
Kampala	Free range chickens	1	WGS	1 Atypical strain	[18]
	Human	1	Multiplex PCR of 5 MS markers	1 Africa 1	[20]

Acknowledgements

We thank the following colleagues for providing human isolates from African patients to the French National Reference Center for toxoplasmosis: Angoulevant A., Bougnoux E., Brenier-Pinchart M.-P., Chemla C., Filisetti D., Fillaux J., Grenouillet F., Houzé S., L'Ollivier C., Marty P., Menotti J., Meroni V., Paris L., Rabodonirina M., Roux P.[†] Tauziede-Espariat A., Villard O., Villena I. and Yera H. We would also like to thank Pailley C. and Moreau J. for the manuscript revision and Boumediene F. for the graphics used in this article.

References

- 1 Dardé, M.L. (2008) *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite* 15, 366-371
- 2 Sánchez, V., *et al.* (2014) Characterization of ROP18 alleles in human toxoplasmosis. *Parasitol. Int.* 63, 463-469
- 3 Xiao, J. and Yolken, R.H. (2015) Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)* 213, 828-845
- 4 Howe, D.K. and Sibley, L.D. (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561-1566
- 5 Ajzenberg, D. (2010) Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future Microbiol* 5, 841-843
- 6 Khan, A., *et al.* (2011) Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.* 41, 645-655
- 7 Ajzenberg, D., *et al.* (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34, 1185-1196

- 8 Bertranpetit, E., *et al.* (2017) Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infect. Genet. Evol.* 48, 150-155
- 9 Ferreira, A.M., *et al.* (2001) Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite* 8, 99-105
- 10 Dubey, J.P., *et al.* (2002) Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int. J. Parasitol.* 32, 99-105
- 11 Carme, B., *et al.* (2002) Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4037-4044
- 12 Gilbert, R.E., *et al.* (2008) Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2, e277
- 13 de-la-Torre, A., *et al.* (2009) Frequency and factors associated with recurrences of ocular toxoplasmosis in a referral centre in Colombia. *Br J Ophthalmol* 93, 1001-1004
- 14 Su, C., *et al.* (2012) Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5844-5849
- 15 Shwab, E.K., *et al.* (2014) Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453-461
- 16 Lorenzi, H., *et al.* (2016) Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun* 7, 10147
- 17 Chaichan, P., *et al.* (2017) Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 53, 227-238
- 18 Bontell, I.L., *et al.* (2009) Whole genome sequencing of a natural recombinant *Toxoplasma gondii* strain reveals chromosome sorting and local allelic variants. *Genome Biol.* 10, R53
- 19 Dubey, J.P. (2016) *Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second Edition*. CRC Press
- 20 Ajzenberg, D., *et al.* (2009) Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 199, 1155-1167
- 21 Bamba, S., *et al.* (2016) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol.* 230, 10-15
- 22 Lindström, I., *et al.* (2006) Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. *Acta Trop.* 100, 218-222
- 23 Dubey, J.P., *et al.* (2003) Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. *Vet. Parasitol.* 114, 89-95
- 24 Dubey, J.P., *et al.* (2005) First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *J. Parasitol.* 91, 69-72
- 25 Abdel-Hameed, D.M. and Hassanein, O.M.A. (2008) Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from female patients with toxoplasmosis. *J Egypt Soc Parasitol* 38, 511-520
- 26 Tolba, M.M., *et al.* (2014) Genotype analysis of *T. gondii* strains associated with human infection in Egypt. *Parasitol. Res.* 113, 1563-1569
- 27 Khan, A., *et al.* (2007) Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14872-14877

- 28 Mercier, A., *et al.* (2010) Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, e876
- 29 Döşkaya, M., *et al.* (2013) Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol. Int.* 62, 471-474
- 30 Al-Kappany, Y.M., *et al.* (2010) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. *J. Parasitol.* 96, 1112-1114
- 31 El Behairy, A.M., *et al.* (2013) Genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates from stray dogs from Giza, Egypt. *Vet. Parasitol.* 193, 25-29
- 32 Dubey, J.P., *et al.* (2013) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. *Vet. Parasitol.* 196, 206-208
- 33 Dubey, J.P., *et al.* (2007) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Sri Lanka and genetic characterization of the parasite isolates. *Vet. Parasitol.* 146, 341-346
- 34 Dubey, J.P., *et al.* (2010) Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Vet. Parasitol.* 172, 195-203
- 35 Gebremedhin, E.Z., *et al.* (2014) Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption. *Parasit Vectors* 7, 425
- 36 Su, C., *et al.* (2003) Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 414-416
- 37 Pedersen, N.C. and Pratt, P.W. (1991) *Feline Husbandry: Diseases and Management in the Multiple-cat Environment*. American Veterinary Publications
- 38 Driscoll, C.A., *et al.* (2007) The Near Eastern origin of cat domestication. *Science* 317, 519-523
- 39 Malek, J. (2006) *The Cat in Ancient Egypt*. British Museum
- 40 Nantet, B. (2008) *Histoire du Sahara et des Sahariens: des origines à la fin des grands empires africains*. Ibis Press
- 41 Marshall, F. and Hildebrand, E. (2002) Cattle Before Crops: The Beginnings of Food Production in Africa. *Journal of World Prehistory* 16, 99-143
- 42 Kropelin, S., *et al.* (2008) Climate-driven ecosystem succession in the Sahara: the past 6000 years. *Science* 320, 765-768
- 43 Brasseur, J. (2016) *Histoire économique de l'Afrique tropicale des origines à nos jours*.
- 44 Allison, A.C. (1954) Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British medical journal* 1, 290-294
- 45 Murray, M., *et al.* (1982) Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Advances in parasitology* 21, 1-68
- 46 Dolan, R.B. (1987) Genetics and trypanotolerance. *Parasitology today (Personal ed.)* 3, 137-143
- 47 Lehmann, T., *et al.* (2006) Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11423-11428
- 48 Khan, A., *et al.* (2009) Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLoS Genet.* 5, e1000404
- 49 Behnke, M.S., *et al.* (2015) Rhostry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Genet.* 11, e1005434
- 50 Lilue, J., *et al.* (2013) Reciprocal virulence and resistance polymorphism in the relationship between *Toxoplasma gondii* and the house mouse. *eLife* 2, e01298

- 51 Jacobs, L. and Jones, F.E. (1950) The Parasitemia in Experimental Toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 87, 78-89
- 52 Frenkel, J.K. (1953) Host, Strain and Treatment Variation as Factors in the Pathogenesis of Toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2, 390-415
- 53 Muller, U.B. and Howard, J.C. (2016) The impact of *Toxoplasma gondii* on the mammalian genome. *Current opinion in microbiology* 32, 19-25
- 54 Shwab, E.K., et al. (2016) The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 46, 141-146
- 55 Demar, M., et al. (2012) Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18, E221-231
- 56 Demar, M., et al. (2007) Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin. Infect. Dis.* 45, e88-95
- 57 Robert-Gangneux, F. and Darde, M.L. (2012) Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews* 25, 264-296
- 58 Pappoe, F., et al. (2017) Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients and food animals and direct genotyping of *T. gondii* isolates, Southern Ghana. *Parasitol. Res.* 116, 1675-1685
- 59 de-la-Torre, A., et al. (2013) Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2541
- 60 Zumla, A., et al. (1991) *Toxoplasma* serology in Zambian and Ugandan patients infected with the human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 227-229
- 61 Lelong, B., et al. (1995) [Prevalence of toxoplasmosis in a population of pregnant women in Antananarivo (Madagascar)]. *Bull Soc Pathol Exot* 88, 46-49
- 62 Wang, Z.-D., et al. (2017) Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV* 4, e177-e188
- 63 Torgerson, P.R. and Mastroiacovo, P. (2013) The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 91, 501-508
- 64 Ronday, M.J., et al. (1996) Aetiology of uveitis in Sierra Leone, west Africa. *Br J Ophthalmol* 80, 956-961
- 65 Gilbert, R.E., et al. (1999) Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol. Infect.* 123, 283-289
- 66 Giroud, P. and Grjebine, A. (1951) [Exanthematous fever and toxoplasmosis in central Congo]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 44, 54-57
- 67 Giroud, P., et al. (1953) [Existence of toxoplasmosis as a disease of adults, whether as a febrile disease or as a boutonneuse fever type of exanthematous infection; test by inoculation of *Toxoplasma*]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 46, 319-323
- 68 Beltrame, A., et al. (2016) Recurrent seizures during acute acquired toxoplasmosis in an immunocompetent traveller returning from Africa. *Infection* 44, 259-262
- 69 Crump, J.A., et al. (2013) Etiology of Severe Non-malaria Febrile Illness in Northern Tanzania: A Prospective Cohort Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2324
- 70 Stoler, J., et al. (2014) Deconstructing "malaria": West Africa as the next front for dengue fever surveillance and control. *Acta Trop.* 134, 58-65
- 71 WHO World Malaria Report 2016 <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.

- 72 Dard, C., *et al.* (2016) Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends Parasitol.* 32, 492-506
- 73 Aspinall, T.V., *et al.* (2002) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction--food for thought? *Int. J. Parasitol.* 32, 1193-1199
- 74 Fazaeli, A., *et al.* (2000) Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *Int. J. Parasitol.* 30, 637-642
- 75 Howe, D.K., *et al.* (1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1411-1414
- 76 Dubey, J.P., *et al.* (2006) Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Vet. Parasitol.* 140, 76-82
- 77 Dubey, J.P., *et al.* (2006) Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. *Vet. Parasitol.* 139, 29-36
- 78 Su, C., *et al.* (2006) Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 36, 841-848
- 79 Dubey, J.P., *et al.* (2007) Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.* 143, 182-188
- 80 Su, C., *et al.* (2010) Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1-11
- 81 Blackston, C.R., *et al.* (2001) High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. *J. Parasitol.* 87, 1472-1475
- 82 Ajzenberg, D., *et al.* (2002) Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32, 27-38
- 83 Ajzenberg, D., *et al.* (2010) Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4641-4645
- 84 Grigg, M.E. and Boothroyd, J.C. (2001) Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 398-400
- 85 Costa, J.-M., *et al.* (2011) Genotyping of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* using high-resolution melting analysis of the repeated B1 gene. *J. Microbiol. Methods* 86, 357-363
- 86 Costa, J.-M., *et al.* (2013) Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluids based on B1 gene polymorphism using minisequencing analysis. *BMC Infect. Dis.* 13, 552
- 87 Yekkour, F., *et al.* (2017) First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria. *Vet. Parasitol.* 239, 31-36
- 88 Velmurugan, G.V., *et al.* (2008) Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet. Parasitol.* 155, 314-318
- 89 Tilahun, G., *et al.* (2013) Prevalence of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens (*Gallus domesticus*) from Addis Ababa, Ethiopia. *J. Parasitol.* 99, 740-741
- 90 Genot, S., *et al.* (2007) Severe *Toxoplasma gondii* I/III recombinant-genotype encephalitis in a human immunodeficiency virus patient. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3138-3140
- 91 Lindström, I., *et al.* (2008) Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology* 135, 39-45

Glossary

Allele: one of the possible alternative sequences (genetic variant) of DNA at a given position (locus). The set of possible alleles in a locus reflects the polymorphism of this locus.

Chromosome painting: an approach for genomic data analysis aiming to estimate the ancestry of regions of the genome, including population identification and admixture dating.

Clade: a group consisting of a given ancestor and all its descendants.

Genotype: the genetic make-up of an individual, the combination of alleles at one or more loci.

Haplogroup: a classification comprising many different genotypes thought to be related.

Clonal lineage: Population consisting of individuals of the same genotype derived from a single individual after successive cycles of mitotic (asexual) division.

Homoplasmy: a phenomenon describing the identity of two identical alleles not resulting from a recent common kinship. The presence of homoplasmy leads to underestimating the total number of mutations that have occurred over time.

Isolate: biological material obtained from living or dead organisms for examination or cultivation purposes. In case of a *T. gondii* infection, an isolate usually contains a single strain of the parasite; presence of more than one strain is designated as a mixed infection.

Locus (locus, loci): region on the DNA molecule (chromosome). The size of this region may greatly vary (from 1 to hundreds of nucleotides).

Marker (Genetic marker): a polymorphic region of a DNA molecule. The sequences of this region may be different between several individuals.

Microsatellite (MS): small portion of DNA consisting of a short DNA sequence (typically 1 to 4 nucleotides) repeated a variable number of times (usually 10 to 40). Each microsatellite corresponds to a single locus in the genome, defined by the unique sequences that frame the repetition. The very high polymorphism (many alleles) of these loci is due to variations in the length of the repetition: this length identifies the alleles of each of these loci.

MLST or Multilocus sequence typing: analysis of the nucleotide sequences of several loci coding for housekeeping genes or of fragments of household genes.

Multiplex PCR: simultaneous amplification of several target sequences (two at least) in the same amplification tube.

RFLP or Restriction Fragment Length Polymorphism: DNA polymorphisms detected after fragmentation of the molecule by the action of restriction enzymes (which create cuts on the molecule at well-defined sites). Digested PCR products are resolved in an agarose gel by electrophoresis or by molecular hybridization with a specific fragment of labeled DNA (called a probe).

Strain: an isolate containing one or more organisms of a given species characterized with some discriminatory typing technique (genotyping, phenotyping, serotyping)

ToxoDB: a genome database for the genus *Toxoplasma*. It incorporates genotyping data for strains analyzed using multilocus PCR-RFLP technique.

Transhumance: the seasonal migration of livestock from one grazing ground to another with the changing of seasons.

Virulence: the ability to cause disease in a given host.

II.3. Principaux résultats

Cette revue de la littérature a fait la synthèse des études portant sur la diversité génotypique des souches africaines de *T. gondii* et publiées jusqu'en mai 2017. Les souches génotypées par analyse multilocus (marqueurs RFLP ou microsatellites) ont été incluses dans la revue. Toutes les souches qui répondaient à ces critères d'inclusion avaient été obtenues à partir de prélèvements réalisés chez l'homme ou chez des animaux domestiques.

- Sur les 371 souches génotypées, environ 94% appartenaient à 5 lignées clonales prédominantes : le type II, le type III, l'*Africa 1* (haplogroupe 6), l'*Africa 3* (haplogroupe 14) et un groupe de souches génétiquement très proches appartenant à l'haplogroupe 13. Cela montre bien la structure clonale de la diversité génétique de *T. gondii* en milieu domestique africain.
- La cartographie par pays des génotypes africains de *T. gondii* a permis de mettre en évidence une structure spatiale contrastée de la diversité du parasite à travers le continent. En Afrique du Nord et de l'Est, le type II apparaît comme étant la lignée prédominante, alors que l'*Africa 1* est quasiment absent. A l'opposé, l'*Africa 1* est très présent en Afrique tropicale, alors que le type II est plus rare. Les déterminants de cette structure restent à élucider.
- Une des hypothèses que nous avons formulée dans cette revue pour expliquer cette structure est le rôle des échanges humains qui ont historiquement lié l'Afrique du Nord et de l'Est à l'Europe et au Moyen-Orient. Ces échanges auraient contribué au fil du temps à homogénéiser la diversité génétique du parasite dans ces régions, où le type II, suivi du type III, représentent aujourd'hui l'essentiel de la diversité du parasite. A contrario, l'isolement géographique de l'Afrique tropicale aurait fait obstacle à cette homogénéisation, ce qui expliquerait la prédominance à ce jour de lignées endémiques africaines comme l'*Africa 1*.
- Une autre hypothèse que nous proposons est que les hôtes de *T. gondii* en milieu domestique pourraient donner un avantage sélectif à certaines souches du parasite au détriment d'autres et contribuer ainsi à façonner la structure des populations de *T. gondii*. Cela ne concernerait que les hôtes qui jouent réellement un rôle important dans le maintien du cycle de transmission de *T. gondii* et donc principalement les rongeurs. Ces petits mammifères sont en effet les proies principales du chat domestique (Langham, 1990 ; Fitzgerald et al., 1991 ; Molsher et al., 1999 ; Turner et Bateson, 2013) et sont considérés comme étant le principal réservoir de *T. gondii* en milieu domestique (Dubey et al., 1995; Hejlíček et al., 1997). Alors que certaines espèces de rongeurs sont très sensibles à la plupart des souches de *T. gondii* et meurent rapidement d'une toxoplasmose aiguë (Jokelainen and Nylund, 2012), d'autres présentent une résistance à un certain nombre de souches plus ou moins virulentes et développent une infection chronique à *T. gondii* (Fujii et al., 1983; Jitender P. Dubey et al., 2016). Si la virulence d'une souche peut s'exprimer, chez certains hôtes particulièrement susceptibles, par une infection mortelle peu favorable à la transmission du parasite, elle pourrait conférer au parasite une capacité accrue à infecter certains hôtes plus résistants et, donc, lui donner un avantage sélectif par rapport à d'autres souches moins virulentes (Khan et al., 2009). Par conséquent, seules les souches qui réussissent à causer une infection chronique

chez les espèces locales de rongeurs seront susceptibles d'être transmises aux chats et de contaminer l'environnement (Lilue et al., 2013). Ce mécanisme contribuerait donc à façonner les structures des populations de *T. gondii* à travers le monde, car la transmission et la persistance des souches de *T. gondii* seraient déterminées par les profils de susceptibilité et de résistance génétique spécifiques aux espèces locales de rongeurs dans chaque environnement (Lilue et al., 2013). La souris domestique (*Mus musculus*) est l'un des rongeurs commensaux les plus répandus à travers le monde et a accompagné les migrations humaines depuis des millénaires (Bonhomme et al., 2011). En Afrique, il n'existe pas de cartographie précise de la distribution des rongeurs commensaux, ni une connaissance suffisante de la susceptibilité de ces espèces aux différentes souches de *T. gondii*. Cependant, il est reconnu que la souris domestique est présente depuis plusieurs millénaires en Afrique du Nord, région où les types II et III sont prédominants, alors qu'elle a été introduite beaucoup plus récemment en Afrique tropicale par les colons européens (Bonhomme et al., 2011; Dalecky et al., 2015), où l'on observe la prédominance de souches africaines autochtones de *T. gondii* (principalement l'*Africa 1*). L'établissement relativement récent de cette espèce de rongeur en Afrique tropicale, *a priori* peu adaptée et possiblement susceptible aux souches africaines de *T. gondii*, pourrait expliquer la persistance de souches autochtones de *T. gondii* dans cette région de l'Afrique. La diversité de souches de *T. gondii* en Afrique tropicale serait donc plutôt maintenue dans un réservoir d'espèces commensales natives que les rongeurs invasifs (souris domestique mais également rat noir) n'ont que partiellement supplanté.

- Chez l'homme immunocompétent, les principales lignées clonales de *T. gondii* identifiées en milieu domestique africain ne seraient pas à même de causer des toxoplasmoses sévères dans la plupart des cas. Une étude montre néanmoins indirectement une incidence importante de toxoplasmose oculaire chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest (Gilbert et al., 1999), une région où l'*Africa 1* est la lignée prédominante du parasite. Ces souches sont très proches de souches du continent sud-américain, où l'on observe la charge de morbidité la plus élevée au monde, en lien avec la toxoplasmose oculaire. L'implication du facteur « souche parasitaire » dans l'incidence de cette forme de la maladie dans les zones où l'*Africa 1* est présent demeure inconnue. Les souches qui circulent dans le milieu sauvage en Afrique le demeurent également. La sévérité de l'infection causée par ce type de souches n'a pas été explorée et pourrait être sous-évaluée en Afrique.

Note : Suite à la publication de cette revue, deux articles récents ont publié des génotypes sud-africains de *T. gondii* (Lukášová et al., 2018; Shwab et al., 2018). Les 10 génotypes rapportés par ces deux études appartiennent tous à la lignée type II. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un maintien de la diversité autochtone de *T. gondii* en Afrique dans les régions tropicales uniquement.

Chapitre III. *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs et autres petits mammifères commensaux du Sénégal

Les conclusions tirées de la revue du chapitre 1 et les perspectives de recherche apportées par ce travail ont notamment souligné l'importance d'explorer l'influence des rongeurs commensaux sur la diversité génétique de *T. gondii* pour tenter d'élucider les déterminants de la structure des populations de *T. gondii* en milieu domestique. Dans ce contexte, les modèles expérimentaux de rongeurs pourraient contribuer à mieux comprendre l'influence possible de ces interactions hôtes-parasites sur la structure des populations de *T. gondii* en évaluant la capacité à infecter et la virulence des différentes souches de *T. gondii* chez les espèces de rongeurs d'intérêt en fonctions de leurs susceptibilités respectives. Cependant les modèles expérimentaux ont plusieurs limites : (1) ils ne sont pas disponibles pour toutes les espèces de rongeurs, (2) les différences génétiques entre les lignées de laboratoire et les rongeurs sauvages ne permettent pas, dans beaucoup de cas, d'extrapoler les résultats obtenus chez ces modèles expérimentaux aux populations naturelles, (3) la conduite d'études expérimentales sur des rongeurs sauvages capturés dans leur milieu naturel semble difficile d'un point de vue logistique et (4) une diversité génétique importante peut exister en milieu naturel dans chacune des espèces de rongeurs. Il nous semble donc primordial d'étudier la diversité génétique et la structure des populations de *T. gondii* chez les rongeurs en conditions naturelles pour minimiser les biais inhérents aux modèles expérimentaux que nous avons évoqués.

Dans ce chapitre, nous avons conduit une revue de la littérature non exhaustive sur l'épidémiologie de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs. Ce travail visait à poser le contexte de l'étude de terrain présentée à la suite de cette revue dans le même chapitre. L'objectif était également de souligner la complexité des interactions qui peuvent exister entre *T. gondii* et ses principaux réservoirs domestiques que sont les rongeurs.

III.1. Epidémiologie de *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs : point bibliographique

III.1.1. Introduction

Durant de nombreuses années, les études portant sur l'épidémiologie de l'infection par *T. gondii* dans les populations naturelles de rongeurs se sont limitées à des estimations des niveaux de prévalence. L'intérêt épidémiologique de ce type d'études a été le plus souvent justifié par l'importance des rongeurs dans le cycle de transmission de *T. gondii*. Ces petits mammifères sont en effet largement présents dans une variété importante d'environnements ruraux et urbains et constituent, pour un grand nombre d'entre eux, une proie de prédilection pour le chat, hôte définitif de ce parasite. Un cycle de transmission basée sur l'infection des rongeurs via les oocystes disséminés dans l'environnement par les chats, et une infection des chats via la prédation des rongeurs infectés, est admis comme étant le mécanisme privilégié du maintien du cycle de transmission de *T. gondii* (Dubey et al., 1995; Hejlícek et al., 1997). Dans ce cadre, la réalisation d'études de prévalence chez les rongeurs semblait être une approche séduisante afin d'estimer l'intensité de la circulation de *T. gondii* dans un contexte épidémiologique donné pour en déduire les risques d'infection pour l'homme ou l'animal (Eve Afonso et al., 2007; Reperant et al., 2009; Vujaníć et al., 2011). Cependant, des incohérences concernant les niveaux de prévalence en fonction de la technique de diagnostic employée ont été relevées à maintes reprises (résumé par Hide, 2016). De plus, un nombre croissant d'études expérimentales et épidémiologiques soulignent les limites du schéma classique du cycle de *T. gondii* dont le maintien serait conditionné par un passage obligatoire du parasite par le chat puis par ses proies (principalement les rongeurs commensaux) (Beverley, 1959; Owen and Trees, 1998; Webster, 1994; Marshall et al., 2004). Ces études éclairent une complexité insoupçonnée des interactions hôtes-parasite et de leurs conséquences épidémiologiques. Ce paradigme scientifique émergent implique la considération d'un grand nombre de facteurs dans l'interprétation des résultats issus d'études de prévalence chez les rongeurs (Gotteland et al., 2014). Ces dernières années, des modèles mathématiques ont été élaborés pour tenter d'appréhender toute la complexité des interactions possibles entre les différents facteurs potentiellement impliqués dans l'épidémiologie de *T. gondii*.

Dans ce sous-chapitre, nous ferons un point sur l'avancée des connaissances en lien avec l'épidémiologie de *T. gondii* chez les rongeurs. Des aborderons d'abord les limites des outils disponibles pour la détection de ce parasite en conditions naturelles. Nous discuterons également des aspects clés qu'il reste à élucider pour une compréhension plus complète des facteurs qui régissent la transmission de *T. gondii* chez les rongeurs.

III.1.2. Techniques de détection de l'infection par *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs

Les études épidémiologiques qui ont visé à estimer les niveaux de prévalence de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs ont employé une ou plusieurs des 3 approches suivantes : la sérologie, la détection moléculaire et l'isolement du parasite par inoculation d'échantillons de tissus à la souris de laboratoire.

III.1.2.1. La détection sérologique

La sérologie permet de mettre en évidence la circulation d'anticorps dirigés contre certains antigènes de surface de *T. gondii* chez l'hôte infecté. Les techniques sérologiques disponibles permettent généralement de détecter les anticorps de type IgG entre une et deux semaines après l'infection (Handman and Remington, 1980). Plusieurs de ces techniques ont déjà été employées pour la détection de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs (ELISA, Indirect Hemagglutination Antibody Test, Indirect fluorescent antibody test, Latex agglutination test, Modified agglutination test) mais aucune de ces techniques n'a été validée par un test Gold standard chez ce type d'hôtes. Pour le test d'agglutination modifié (MAT), qui est le test le plus communément employé du fait de sa simplicité, des seuils de positivité différents ont été retenus d'une étude à l'autre allant d'une dilution à 1:6 (Gotteland et al., 2014) à une dilution à 1:40 (Afonso et al., 2007). Cette situation rend les résultats issus des différentes études difficilement comparables.

De plus, plusieurs facteurs pourraient affecter la spécificité et la sensibilité des techniques sérologiques et contribuer à sous-estimer ou surestimer la prévalence de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs en particulier. L'absence d'anticorps détectables chez un rongeur infecté (faux négatif) pourrait bien entendu être liée à une infection très récente pour laquelle une réponse humorale spécifique ne s'est pas encore développée ou au contraire très ancienne due à une baisse du titre d'anticorps en circulation chez les individus ayant développé une infection chronique. Un autre cas de figure concerne les rongeurs infectés par voie congénitale, chez qui il a été observé une absence d'anticorps détectables à la naissance ou quelques semaines après la naissance (Beverley, 1959; Jacobs, 1966; Dubey et al., 1997; Owen and Trees, 1998), et ce malgré une infection toxoplasmique avérée (vérifiée par détection moléculaire ou isolement du parasite). Des réactions croisées de l'antigène de *T. gondii* employé pour la sérologie avec des anticorps dirigés contre des organismes génétiquement proches de *T. gondii* comme *Neospora* ou *Hammondia* ont également été démontrées (résumé par Gondim et al., 2017) et pourraient contribuer à une surestimation de la prévalence de *T. gondii* chez les rongeurs dans certains cas.

III.1.2.2. La détection moléculaire

Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire. Après l'infection, les tachyzoïtes circulent dans les fluides biologiques (essentiellement le sang et la lymphe) durant une courte période pour se propager dans l'organisme, puis échappent à la réponse immunitaire de l'hôte en formant des kystes intracellulaires dans différents types de tissus. Les outils de détection moléculaire par PCR permettent, après l'extraction de l'ADN réalisée à partir d'échantillons de tissu, de détecter l'ADN de *T. gondii* si l'échantillon de tissu prélevé contient au moins un kyste du parasite. Plusieurs techniques PCR pour la détection de *T. gondii* ont été développées et montrent des niveaux de sensibilité et spécificité élevés (Burg et al., 1989; Savva et al., 1990; Homan et al., 2000; Cresti et al., 2001). Certaines techniques, qui se basent sur l'amplification de séquences génomiques présentant un nombre important de copies dans le génome (comme le gène *B1* ou la séquence *AF146527*), permettent de détecter l'ADN de *T. gondii* dans un échantillon contenant un très petit nombre de toxoplasmes (jusqu'à un seul toxoplasme). D'autres techniques, qui se basent sur l'amplification de gènes présents en copie unique dans le génome (comme le gène *SAG1*), ont été optimisées par des protocoles qui emploient la PCR nichée, ce qui

augmente tout de même les risques de contamination des échantillons. Chez les rongeurs, la préoccupation principale concernant le diagnostic moléculaire de l'infection réside dans la sélection du prélèvement de tissu adéquat pour l'extraction de l'ADN avant la PCR. Théoriquement, si le prélèvement soumis à extraction contient un seul kyste (qui contient plusieurs centaines à plusieurs milliers de bradyzoïtes (Dubey, 2009)), la sensibilité des techniques de PCR disponibles devraient amplement suffire à détecter l'ADN du parasite. Le choix de l'organe à prélever et la taille de l'échantillon prélevé apparaissent donc comme des aspects primordiaux à prendre en compte pour optimiser les chances de détecter le parasite. Chez les rats et les souris de laboratoire porteurs d'une infection chronique par *T. gondii*, il est reconnu que les kystes se concentrent principalement dans leurs cerveaux (Dubey, 1997). En revanche, des infections expérimentales réalisées sur des rongeurs de l'espèce *Calomys callosus* ont montré que le foie était le principal organe de tropisme pour *T. gondii* chez cette espèce (Favoreto-Júnior et al., 1998). Également, Dubey et collaborateurs (2016) ont montré des variations dans la distribution (souvent non homogène) et dans la densité des kystes cérébraux au sein d'une même espèce (*Rattus norvegicus*) par des observations réalisées sur plusieurs lignées de rats de laboratoires. Ces données suggèrent que le prélèvement d'une partie de tissu cérébral pour l'extraction de l'ADN chez un individu infecté pour lequel la distribution des kystes cérébraux est non homogène pourrait être à l'origine d'un résultat de PCR faussement négatif. Par exemple, une étude de prévalence moléculaire a identifié 12 rongeurs positifs par PCR sur 79 rongeurs testés (Kijlstra et al., 2008). Dans cette étude, pour chacun des rongeurs, des extractions d'ADN ont été réalisées séparément sur 30 mg de cœur et 30 mg de cerveau. Aucun des 12 rongeurs n'était positif pour le cœur et le cerveau ensemble mais uniquement pour un des deux types de prélèvement à chaque fois, ce qui pourrait s'expliquer par la petite taille des prélèvements soumis à extraction.

III.1.2.3. L'isolement de *Toxoplasma gondii* par inoculation à la souris

Les lignées conventionnelles de souris de laboratoires sont très sensibles à l'infection par *T. gondii* et développent des charges parasitaires élevées de kystes ou de tachyzoïtes en fonction de la virulence de la souche. Les kystes ou les tachyzoïtes, présents en grande quantité, sont assez facilement visibles au microscope. L'inoculation d'échantillons de tissus prélevés sur des rongeurs sauvages à des souris de laboratoire permet donc de mettre en évidence la présence d'une infection par *T. gondii* à l'aide d'une méthode basée sur la détection visuelle, qui est donc très spécifique et ne prête pas à erreur pour un œil exercé. Cependant, la viabilité des toxoplasmes contenus dans l'échantillon doit être prise en compte pour le succès de l'isolement, car elle diminue sensiblement avec le prolongement du délai entre la mort de l'hôte prélevé et le moment de l'inoculation de l'échantillon aux souris de laboratoire. Il est à noter que l'isolement sur souris échoue également parfois pour des raisons inconnues malgré une PCR positive sur une partie de l'échantillon soumis à inoculation (Gotteland et al., 2014), ce qui interroge également sur la sensibilité de cette technique.

III.1.2.4. Comparaison des techniques de détection

Dans les études de prévalence chez les rongeurs où plus d'une méthode de détection a été utilisée, des incohérences ont pu être observées à maintes reprises en confrontant les

résultats obtenus par les différentes méthodes (Dubey et al., 1995; Owen and Trees, 1998; Araújo et al., 2010; Gotteland et al., 2014). Cependant, aucune étude n'a eu pour but de comparer les résultats obtenus par des méthodes diagnostiques différentes chez les rongeurs afin d'évaluer les niveaux de concordance entre les tests. A ce jour, l'absence de technique gold standard fait qu'aucune de ces techniques n'a pu être validée chez les différentes espèces de rongeurs étudiées.

III.1.3. L'apport des études empiriques dans la compréhension de l'épidémiologie de *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs

Des études expérimentales conduites sur les rongeurs en condition de laboratoire ont permis d'identifier des mécanismes de transmission et des interactions hôtes-parasite qui pourraient avoir une importance clé dans le cycle du toxoplasme. Des études de terrain ont tenté d'explorer leurs rôles en conditions naturelles.

III.1.3.1. Voies de transmission de *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs

Chez les rongeurs, *T. gondii* peut se transmettre par voie orale, verticale ou vénérienne. Cependant, ces voies de transmission ne sont pas partagées par toutes les espèces ou par toutes les lignées dans chaque espèce.

III.1.3.1.1. La transmission orale

Comme nous l'avons développé plus haut, les oocystes montrent un fort potentiel infectieux chez les rongeurs et de très faibles doses d'oocystes sont suffisantes pour induire une infection. Les rongeurs peuvent également s'infecter en ingérant des bradyzoïtes de *T. gondii* (Dubey, 2006), ce qui peut être une source d'infection pour certains rongeurs qui montrent des comportements de cannibalisme ou de charognage.

III.1.3.1.2. La transmission verticale

Plusieurs types de transmission verticale existent chez les rongeurs et varient encore une fois d'une espèce à l'autre. Comme pour l'homme, les fœtus de plusieurs espèces de rongeurs peuvent s'infecter par voie transplacentaire en cas d'infection de la mère durant la période de gestation (Flori et al., 2002; Freyre et al., 2009; Roberts and Alexander, 1992). Chez la souris (*Mus musculus*), Beverley (1959) a démontré que la transmission congénitale pouvait permettre à elle seule le maintien de l'infection par *T. gondii* de génération en génération. Cela s'expliquerait par une réactivation de l'infection chronique par *T. gondii* durant la gestation et un passage des tachyzoïtes sanguins aux fœtus par voie transplacentaire. Cette observation a été plus tard confirmée par Owen et Trees (1998) sur des lignées sauvages de souris (*Mus musculus*) maintenues en captivité. Une transmission sur plusieurs générations de l'infection par *T. gondii* a été démontrée de façon beaucoup plus ponctuelle chez certaines lignées de rats (*Rattus norvegicus*), sur deux générations seulement (Dubey et al., 1997). Ces résultats suggèrent la possibilité d'une transmission de

T. gondii uniquement entre hôtes intermédiaires en conditions naturelles, avec la possibilité d'un maintien du cycle en absence de chats par multiplication asexuée. Ce mécanisme a été proposé comme une explication à la structure clonale des populations de *T. gondii* (Worth et al., 2013). Néanmoins plusieurs observations qui pourraient limiter l'importance de la transmission verticale en conditions naturelles doivent être soulignées. Chez la souris, la transmission congénitale est en effet associée à des portées moins nombreuses et à une mortalité importante des souriceaux (Beverley, 1959). Des changements comportementaux observés chez les souris infectées par voie congénitale pourraient également réduire la durée de vie de ces souris en facilitant leur prédation par les chats et de ce fait réduire leurs chances d'atteindre l'âge de la maturité sexuelle pour à leur tour transmettre le parasite à la génération suivante. La transmission verticale de *T. gondii* via la lactation a également été décrite chez la souris (Eichenwald, 1948; Beverley, 1959) et le hamster (Freyre et al., 2009) uniquement dans le cas d'une infection de la mère durant les périodes de gestation et/ou de lactation et non dans le cas d'une infection chronique ancienne. Ce mode de transmission n'a pas pu être mis en évidence chez plusieurs lignées de rats de laboratoire (Dubey et Frenkel, 1973; Dubey et Shen, 1991; Zenner et al., 1993; Paulino et Vitor, 1999) et chez certaines lignées de souris (BALB/c) (Roberts and Alexander, 1992). Ces données expérimentales suggèrent que la transmission verticale pourrait être une voie de transmission non-négligeable de *T. gondii*. En revanche, ces données ne permettent pas d'estimer l'importance relative de cette voie de transmission par rapport aux autres voies de transmission en conditions naturelles.

Plusieurs études de terrain, toutes conduites au Royaume-Uni, ont montré des niveaux de prévalence de l'infection par *T. gondii* pouvant atteindre 35% chez le rat brun (Webster, 1994), 41% chez le mulot gris (Thomasson et al., 2011; Bajnok et al., 2015) et jusqu'à 59% chez la souris (Marshall et al., 2004) dans des zones où les chats sont rares ou absents. Ces observations suggèrent la possibilité d'un maintien du cycle de transmission de *T. gondii* en absence de chats, probablement par une transmission congénitale de l'infection d'une génération à la suivante. Ces niveaux de prévalence, en plus d'être rapportés dans des zones où les chats sont rares, semblent inhabituellement élevés chez le mulot et la souris, et interrogent de ce fait sur la fiabilité des résultats obtenus. En effet, les autres études menées à ce jour qui traitaient de la prévalence chez le mulot (n=5) ont montré des niveaux de prévalence qui variaient de 0 à 10% (Doby et al., 1974; Kapperud, 1978; Jackson and Siim, 1986; Hejlícek et al., 1997; Afonso et al., 2007). La différence est encore plus flagrante dans 14 études qui traitent de la prévalence chez la souris que nous avons répertoriées et dans lesquelles des niveaux de prévalence varient de 0 à 6,5% (Afonso et al., 2007; Dabritz et al., 2008; Kijlstra et al., 2008; Mercier et al., 2013). Les prévalences très élevées pourraient être dues à un emploi inadapté des méthodes de détections utilisées (cf III.1.2). En effet, Webster (1994) a retenu un seuil de positivité à 1:10 pour le test d'agglutination au latex (LAT) pour la détection de l'infection à *T. gondii* chez les rats testés, alors que le seuil habituellement employé est à 1:32 comme souligné par Dubey (2009). Les autres études de prévalence conduites au Royaume-Uni sur la souris et le mulot gris, toutes issus du même laboratoire, avaient quant à elle employé la détection par PCR nichée, connue comme une méthode à haut risque de contamination.

Bajnok et al. (2015), pour tenter de mettre en évidence les modes de transmission en jeu dans une population naturelle de mulots (*Apodemus sylvaticus*), ont exploré l'association qu'il pourrait y avoir entre les liens de parenté qui unissent les individus de la population et leur statut infectieux. Leur hypothèse était qu'un rôle prépondérant de la transmission verticale conduirait à une transmission privilégiée du parasite entre les individus unis par des

liens de parenté. Pour cela, ils ont comparé les niveaux de prévalence de l'infection à *T. gondii* chez une population de mulots échantillonnée dans 4 sites répartis sur un rayon d'environ 400 mètres. Le génotypage des individus qui composent cette population a permis d'identifier quatre sous-populations génétiquement définies réparties de façon différenciée entre les quatre sites d'échantillonnage. L'absence d'une différence significative dans les niveaux de prévalence entre les sites d'échantillonnage de la zone étudiée et une différence significative dans les niveaux de prévalence entre les sous-populations génétiques ont permis de tirer la conclusion d'un rôle prédominant de la transmission verticale dans la circulation de *T. gondii* dans cette population. Cependant, des individus infectés ont été identifiés parmi chacune des 4 sous-populations génétiques. De plus, la distribution des individus issus des 4 sous-populations génétiques dans les 4 sites d'échantillonnage n'était pas aléatoire ($P= 0,0000001$). La comparaison des niveaux de prévalence entre les différentes sous-populations génétiques dans chacun des sites d'échantillonnage aurait contribué à étayer la conclusion sur les voies de transmission de *T. gondii* en éliminant toute influence possible de la localisation. D'autres études seront nécessaires pour conclure quant à l'importance de la transmission verticale dans le maintien de niveaux de prévalence élevés dans les populations naturelles de rongeurs.

III.1.3.1.3. La transmission vénérienne

Peu d'études ont exploré la possibilité de transmission de *T. gondii* par voie sexuelle. Dass et collaborateurs (2011) ont montré que les rats mâles infectés pouvaient transmettre l'infection aux femelles pendant au moins 8 semaines après leur infection. Chez la souris BALB/c, Asgari et al. (2015) ont montré la présence de tachyzoïtes de *T. gondii* dans le sperme de mâles récemment infectés (48 heures post-infection) mais la transmission du parasite par la voie vénérienne n'a pas pu être démontrée. Il est à noter que les mâles ont été infectés par la souche RH (mortelle pour la souris) et ont été mis en contact des femelles 48 heures après l'infection, donc durant la phase aiguë de l'infection. Les mâles infectés ont tous montré une propension à l'accouplement largement diminuée et ont succombé à l'infection 5 jours post-inoculation. Les connaissances relatives à cette voie de transmission chez les rongeurs méritent d'être approfondies.

III.1.3.2. Susceptibilité et résistance des rongeurs à l'infection par *Toxoplasma gondii*

III.1.3.2.1. Génétique de l'hôte et génétique du parasite

Des infections expérimentales de diverses espèces de rongeurs ont mis en évidence des variations significatives de susceptibilité des rongeurs à la toxoplasmose clinique variait significativement d'une espèce à l'autre. De manière générale, les différentes lignées de rats de laboratoire (*Rattus norvegicus*) montrent une résistance notable à la toxoplasmose clinique, même dans en cas d'ingestion d'une dose importante d'oocystes (100 000 oocystes) (Dubey et al., 2016). Dans cette espèce, seules certaines souches atypiques et celles de type I induisent une infection létale chez ces rats mais avec ingestion de très fortes doses d'oocystes (100 000 oocystes). A l'opposé, certaines espèces comme la gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*), meurent suite à leur infection par des souches peu

virulentes pour l'homme ou la souris de laboratoire, telle que la souche VEG (type III), et ce, même à très faible dose (5 oocystes par voie orale ou 15 oocystes par voie péritonéale) (Frazão-Teixeira et al., 2002). Chez une même espèce de rongeur, des différences de susceptibilité à la toxoplasmose clinique ont également été démontrées. Les souris de laboratoire (*Mus musculus*) appartenant aux lignées dites « conventionnelles » (Swiss, Balb/c, C57BL/6) meurent d'infections causées par les souches de type I (souche RH) indépendamment de la dose inoculée (Howe et al., 1996; Dardé, 2008). Certaines lignées comme les souris CIM montrent en revanche une résistance à ce type de souches et développent une infection chronique (Lilue et al., 2013). Parmi les populations naturelles de souris à travers le monde, une grande diversité d'allèles de gènes impliqués dans la résistance aux souches virulentes de *T. gondii* a été mise en évidence (Lilue et al., 2013). Ces différences de susceptibilités potentielles pourraient avoir des conséquences importantes sur les niveaux de prévalence de l'infection à *T. gondii* d'une espèce à l'autre (ou entre différentes lignées d'une même espèce) en conditions naturelles. Par exemple, des examens post-mortem ont été réalisés, par un laboratoire de pathologie de la faune sauvage en Finlande, sur trois écureuils (*Sciurus vulgaris*) collectés dans la nature (Jokelainen and Nylund, 2012). Les résultats ont montré qu'une toxoplasmose aiguë généralisée était la cause de la mortalité (confirmée par immunohistochimie) de ces rongeurs. Le génotypage multilocus des souches infectantes a révélé une infection par la lignée de type II dans les trois cas. Ces résultats montrent qu'une lignée connue pour être peu virulente pour la souris de laboratoire peut provoquer une toxoplasmose généralisée fatale chez d'autres espèces de rongeurs. La susceptibilité de ces écureuils à *T. gondii* peut probablement s'expliquer par leur faible exposition au parasite durant leur histoire évolutive, du fait de leur mode de vie arboricole qui limite leur contact avec le sol (de Thoisy et al., 2003). De même, des examens post-mortem réalisés sur des lièvres (lagomorphes) morts et collectés dans la nature ont montré qu'une toxoplasmose aiguë généralisée était la cause de la mortalité chez 14 (8,1 %) des 173 lièvres bruns d'Europe (*Lepus europaeus*) et chez 4 (2,7 %) des 148 lièvres de montagne (*Lepus timidus*) (Jokelainen et al., 2011). Chez ces deux espèces de lièvres sauvages, une infection naturelle par *T. gondii* a provoqué une toxoplasmose généralisée fatale. De ce fait, il apparaît que les méthodes de piégeage classique peuvent induire un biais important dans les études de prévalence par espèce. En effet, le piégeage ne permettra probablement pas d'identifier les individus infectés appartenant à des espèces susceptibles qui développeront une infection mortelle à *T. gondii*. A contrario, la prévalence de l'infection chez les espèces résistantes pourra plus aisément être caractérisée car les individus appartenant à ces espèces développeront une infection chronique à *T. gondii*. Ce facteur devrait être pris en compte dans l'interprétation des niveaux de prévalence de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs capturés par piégeage.

III.1.3.2.2. Effet de l'inoculum et du stade infectieux

Contrairement au chat, chez lequel les oocystes montrent une faible infectiosité (Dubey, 2006), la souris (*Mus musculus*) ou le rat brun (*Rattus norvegicus*) peuvent s'infecter en ingérant un seul oocyste (Dubey and Frenkel, 1973; Dubey, 1996). Cependant, si le rat se montre résistant à de fortes doses d'oocystes dans la plupart des cas et survit à l'infection, la souris développe souvent une infection létale avec quelques dizaines d'oocystes (Dubey, 1996). Des taux élevés de mortalité chez des lignées sauvages de souris (*Mus musculus*) maintenues en captivité ont également été observés en cas d'ingestion de doses

supérieures à 50 oocystes. En conditions naturelles, certains facteurs environnementaux comme le type de sol et le taux de précipitation, pourraient avoir une influence importante sur la dissémination des oocystes, sur leur densité par unité de surface au sol, et donc, sur la probabilité des hôtes à ingérer de fortes doses d'oocystes. Par exemple, une dissémination réduite des oocystes à la surface du sol, en plus de limiter l'incidence de l'infection chez les rongeurs, serait le plus souvent associée à l'ingestion de fortes doses d'oocystes concentrés dans des points bien localisés et donc possiblement à une issue fatale de l'infection. A l'opposé, une dissémination importante des oocystes dans l'espace conduira probablement à des taux d'incidence plus élevés et à l'ingestion de doses inoffensives d'oocystes, conduisant au développement d'infections chroniques par *T. gondii*. Cela donne la mesure des conséquences possibles de ces facteurs sur les niveaux de prévalence de l'infection par *T. gondii* en fonction de la susceptibilité des différentes espèces de rongeurs.

III.1.3.2.3. Effet des co-infections impliquant *Toxoplasma gondii* et un autre organisme infectieux

Des co-infections expérimentales de souris de laboratoire impliquant une infection par *T. gondii* et d'autres microorganismes parasites ont montré l'apparition d'interactions entre les différentes voies de signalisation immunitaires de l'hôte pour le contrôle de ces infections parasites distinctes. Une étude par Liesenfeld et al. (2004) a notamment montré que l'infection de souris par *T. gondii* avant la co-infection avec le nématode *Nippostrongylus brasiliensis* inhibe le développement de la réponse Th-2 habituellement induite par le nématode et qu'elle est associée à une production d'œufs de *N. brasiliensis* plus importante et prolongée. Des résultats comparables ont été obtenus lors de co-infections de souris impliquant *Leishmania major* et *T. gondii* (Santiago et al., 1999) et chez des souris infestées par le nématode *Heligmosomoides polygyrus* suite à une infection par *T. gondii* (Ahmed et al., 2017). Khan et collaborateurs (2008) ont montré que l'infection de souris par le nématode *Heligmosomoides polygyrus* antérieurement à une infection par *T. gondii* pouvait, cette fois-ci, inhiber le développement de la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8 dirigée contre *T. gondii*, qui est importante dans la protection à long terme contre ce protozoaire. Des interactions plus complexes ont été révélées par Welter et collaborateurs (2006), qui ont exploré les interactions immunitaires dans le cas d'une co-infection impliquant *T. gondii* et *Myocoptes musculus* (agent responsable d'une pseudogale chez certaines espèces de rongeurs dont la souris). Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que la réponse immunitaire induite par *M. musculus* interfère avec la réponse immunitaire de type 1 induite par *T. gondii* et que cette altération est préjudiciable à l'hôte. D'autre part, lorsque l'effet pathologique de *T. gondii* sur l'intestin de la souris infectée a été considéré, la réponse immunitaire induite par *M. musculus* a semblé réduire la gravité des lésions intestinales causée par une réponse immunitaire Th-1 excessive due à l'infection par *T. gondii*. Récemment, Souza et collaborateurs (2017) ont montré que l'infection chronique par *T. gondii* était délétère pour la souris en cas de septicémie polymicrobienne et causait une inflammation systémique exacerbée. Tous ces résultats issus d'études expérimentales soulignent la complexité des interactions immunitaires qui sont en jeu lors de co-infections impliquant *T. gondii* et d'autres organismes infectieux. L'influence des co-infections impliquant *T. gondii* sur la survie et la dynamique des populations de rongeurs en condition naturelle pourrait être non négligeable mais demeure à ce jour inexplorée.

III.1.3.3. Rôle de la manipulation parasitaire dans le cycle de *Toxoplasma gondii*

Des études expérimentales conduites chez des souris et des rats ont montré que *T. gondii* pouvait modifier le comportement de ces deux proies naturelles du chat (Webster et al., 1994; Gonzalez et al., 2007). En particulier, l'aversion naturelle de ces rongeurs pour les odeurs d'urine ou de fourrure de chat a diminué significativement après infection par *T. gondii* (Berdoy et al., 2000; Vyas et al., 2007). Les résultats obtenus montrent néanmoins que la durée, l'intensité et l'expression de la manipulation peuvent varier (Witting, 1979; Hrdá et al., 2000; Kannan et al., 2010; Gulinello et al., 2010); il est donc possible que la manipulation parasitaire soit d'une importance variable d'un environnement à l'autre en fonction de l'hôte et de la souche du parasite (Lélu et al., 2013). Concernant le facteur souche, Kannan et collaborateurs (2010) ont mis en évidence des différences significatives dans la durée des changements comportementaux induits par *T. gondii* chez une même lignée de souris en fonction de la souche parasitaire inoculée. Les souches comparées, ME49 et PRU, ont notamment induit une diminution de l'aversion pour l'urine de chat qui a persisté pendant 2 mois et 7 mois, respectivement. Il semble important de souligner que ces différences concernent des souches qui sont génétiquement très proches, appartenant toutes deux à la lignée type II. La capacité de *T. gondii* à manipuler le comportement de son hôte intermédiaire pour faciliter sa transmission à son hôte définitif par prédation est devenu un postulat largement admis dans la communauté scientifique (Poulin, 2010; Webster and McConkey, 2010). Cependant, Worth et collaborateurs (2013) ont souligné des contradictions dans les résultats issus des différentes études expérimentales. Ces contradictions ont été attribuées au manque de standardisation dans la conception des différentes études, avec une variabilité d'espèces hôtes, de souches du parasite, de types de tests comportementaux, de périodes post-infection, de doses inoculées, de stades parasitaires et de voies d'infection. Également, la spécificité de ces modifications comportementales dans le sens d'une facilitation de la prédation du rongeur infecté par le chat est loin d'être démontrée. Par exemple, les souris infectées par *Eimeria vermiformis* (un parasite qui n'a pas besoin d'une prédation par le chat pour achever son cycle biologique) présentent une diminution de l'évitement des odeurs de chat similaire à celle observée chez les rongeurs infectés par *T. gondii* (Kavaliers and Colwell, 1995). L'influence des modifications comportementales induites par l'infection par *T. gondii* sur la survie et la dynamique des populations de rongeurs en condition naturelle demeure inconnue.

III.1.3.4. Rôle des facteurs environnementaux dans le cycle de *Toxoplasma gondii*

Les oocystes de *T. gondii* disséminés par les chats contaminent l'environnement et se montrent aussi bien résistants dans l'eau (Jones et Dubey, 2010) que dans le sol (Dumètre et Dardé, 2003). Comme les rongeurs puisent leurs besoins en eau principalement dans les aliments qu'ils consomment (Jameson and Peeters, 2004), ce sont les oocystes présents sur le sol qui sont les plus susceptibles de les infecter. Des études ont identifié les environnements associés à une forte densité de chats (unique source de contamination du sol) comme étant le principal facteur de risque d'infection des rongeurs (Lehmann et al., 2003; Gotteland et al., 2014). Ces études ont montré que la prévalence de l'infection chez les rongeurs diminuait avec la distance qui les sépare de la ferme ou de l'exploitation

d'élevage la plus proche où de fortes densités de chats se concentrent habituellement. Le rôle de la contamination environnementale sur la prévalence de l'infection chez les rongeurs a pu également être interprété indirectement dans certaines études à partir des différences de niveaux de prévalence entre les espèces de rongeurs en fonction de leur taille, de leur espérance de vie et de leurs habitudes alimentaires. Par exemple, une corrélation positive entre la masse corporelle des rongeurs et leur probabilité d'être séropositifs pour l'infection par *T. gondii* a été trouvée à la fois chez une espèce donnée (en raison de l'âge) et entre les espèces (les espèces plus grandes ayant une durée de vie plus longue et souvent un territoire plus étendu) (Afonso et al., 2007; Dabritz et al., 2008; Reperant et al., 2009). Des spécificités écologiques propres à chaque espèce et qui sont associées à la probabilité de contact avec les oocystes semblent également influencer sur la prévalence de l'infection (de Thoisy et al., 2003; Ruiz and Frenkel, 1980). Par exemple, les espèces fouisseuses qui vivent dans des terriers (comme *Arvicola terrestris scherman*) sont toujours en contact avec le sol et se nourrissent d'hôtes paraténiques de *T. gondii* (tels que les vers de terre); elles sont donc probablement plus à risque de s'infecter par rapport à d'autres espèces (Afonso et al., 2007). Ces observations ont conduit à la conclusion que les rongeurs étaient globalement de bons bio-indicateurs de la contamination environnementale par les oocystes. A l'opposé, d'autres études rapportent des niveaux de prévalence relativement élevés chez les rongeurs dans des zones où les chats sont rares ou absents (Webster, 1994; Marshall et al., 2004; Murphy et al., 2008; Thomasson et al., 2011). L'infection de ces rongeurs ne semble donc pas associée à la contamination environnementale par les oocystes et a plutôt été attribuée dans ce cas à une transmission verticale du parasite. Ces résultats montrent que, pour une même espèce de rongeurs, l'importance de l'influence des facteurs environnementaux sur la prévalence de l'infection par *T. gondii* peut varier grandement, et ce pour des raisons qui demeurent inconnues.

III.1.4. L'apport de la modélisation dans la compréhension de l'épidémiologie de *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs

Des modèles mathématiques ont été développés pour tenter de proposer des schémas épidémiologiques cohérents qui prennent en compte un maximum de facteurs potentiellement impliqués dans l'épidémiologie de *T. gondii* et qui considèrent la complexité de leurs interactions. Mateus-Pinilla et collaborateurs (2002) ont élaboré le premier modèle mathématique de la transmission de *T. gondii*. Ce modèle prend en compte les différents stades d'infection du chat mais exclut les hôtes intermédiaires. Les auteurs justifient ce choix par le fait que la fréquence de dissémination d'oocystes par les chats permet de déduire la prévalence de l'infection chez les rongeurs ou les oiseaux, qui sont les principales sources d'infection pour le chat. Lélou et collaborateurs (2010) ont été les premiers à comparer la transmission de *T. gondii* dans un cycle simple (entre hôtes définitifs) avec la transmission de *T. gondii* dans un cycle complexe (incluant les hôtes intermédiaires et les hôtes définitifs). Leur analyse a montré qu'il existe un taux seuil de prédation qui détermine si le cycle de transmission simple ou complexe prédomine dans le maintien du cycle de *T. gondii*. Un modèle élaboré par Turner et al. (2013) va plus loin en incluant de nouveaux paramètres tels que l'influence de la virulence, de la transmission verticale et la manipulation parasitaire sur le cycle de transmission de *T. gondii*. Les résultats du modèle suggèrent notamment que ce sont les différences de densité (ou d'abondance) d'hôtes intermédiaires et définitifs d'un contexte épidémiologique à l'autre qui déterminent en grande part les importances relatives

des différentes voies de transmission. Lorsque la densité d'hôtes est faible ou que la prédation est peu fréquente, c'est principalement la capacité du parasite à se transmettre par voie verticale entre les hôtes intermédiaires qui détermine le maintien (ou non) du cycle de transmission. La transmission verticale semble donc plus profitable dans un contexte où le parasite lutte pour sa survie. La transmission verticale n'est en revanche pas nécessaire dans les situations où les chats sont présents en densités importantes et où ils ont un contact fréquent avec les oocystes. En revanche, dans un contexte où les chats et les rongeurs sont présents en densités importantes et où la prédation des rongeurs est fréquente, le cycle trophique devient le principal mode de transmission du parasite. Dans cette situation, la manipulation parasitaire exerce une influence complexe sur le cycle de transmission du parasite. D'une part, la prédation accrue des hôtes infectés augmente la transmission de l'infection d'un hôte à l'autre; d'autre part, cette prédation accrue contribue à diminuer la prévalence de l'infection chez les hôtes intermédiaires. Par conséquent, le résultat global de l'influence de la manipulation parasitaire semble tendre vers un compromis entre ces effets apparemment contradictoires. Les mécanismes qui permettent une évolution de la transmission du parasite vers la transmission verticale ou la transmission orale demeurent inconnus. Théoriquement, une femelle souris infectée par *T. gondii* par voie congénitale pourra transmettre l'infection aux différentes portées qu'elle aura durant toute sa vie (Owen et Trees, 1998). En revanche, si cette femelle infectée est la proie d'un chat, la transmission du parasite ne se fera qu'une seule fois et, surtout, uniquement si ce chat fait une primo-infection. Il apparaît donc que la transmission verticale est avantageuse dans la plupart des contextes, sauf dans le cas d'une pression de prédation extrême qui, alliée à la manipulation parasitaire, réduirait significativement les chances de reproduction des femelles infectées et, donc, d'une transmission congénitale du parasite. Un modèle développé par Lélou et collaborateurs (2013) soutient entre autres l'importance de considérer la variabilité des souches parasitaires pour expliquer les différences de modes de transmission. Les souches parasitaires pourraient, en effet, montrer des capacités variables à se transmettre par voie verticale ou à manipuler leur hôte pour faciliter leur transmission par voie trophique. Une variabilité dans l'expression des changements comportementaux chez un même type d'hôtes en fonction de la souche parasitaire inoculée a déjà été observée par Kannan et collaborateurs (2010) (voir la partie sur le rôle de la manipulation parasitaire dans le cycle de *T. gondii*). Concernant la transmission verticale, les différentes études expérimentales disponibles réalisées sur différentes espèces de rongeurs ont utilisé des souches parasitaires différentes à chaque fois (Beverley, 1959; Dubey et al., 1997; Owen and Trees, 1998; Flori et al., 2002; Freyre et al., 2009). Cette situation fait qu'il est impossible, à l'heure actuelle, de distinguer l'influence du facteur « parasite » de celle du facteur « hôte » dans ce type de transmission.

III.1.5. Conclusion

En conclusion, l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs implique l'interaction de nombreux facteurs abiotiques et biotiques qui, probablement, contribuent à créer une multitude de situations épidémiologiques différentes et déterminent les niveaux de prévalence de l'infection et la dynamique de transmission. L'étude de ces interactions en conditions naturelles représente aujourd'hui un défi et nécessite le développement d'approches innovantes pour discerner et évaluer la contribution de chacun des facteurs en lien avec l'épidémiologie de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs. Aussi, les limites inhérentes à

chaque type de méthode diagnostique pourraient conduire à des biais significatifs dans l'estimation des niveaux de prévalence qui méritent d'être évalués.

III.2. *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs et autres petits mammifères commensaux du Sénégal : étude de terrain

III.2.1. Introduction

Dans cette étude de terrain, nous avons tiré parti de plusieurs campagnes de captures de rongeurs et d'autres petits mammifères commensaux menées par nos collaborateurs du Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP), entre septembre 2015 et septembre 2016, dans les villes côtières de Dakar, Rufisque et Joal-Fadiouth. Ces piégeages ont eu lieu dans le cadre de deux projets de recherche : le projet *Chancira* dont le but était de définir les déterminants de la propagation du rat noir en tant que vecteur d'anthropozoonoses majeures et un projet en cours sur les communautés de rongeurs à Dakar et leurs dynamiques populationnelles pour lequel nous avons participé à l'échantillonnage. Dans les 3 zones échantillonnées, la souris domestique (*Mus musculus domesticus*) était l'espèce la plus abondamment capturée. Le rat noir (*Rattus rattus*) a également été trouvé dans ces zones, bien que moins souvent que la souris domestique. Deux espèces africaines natives ont également été identifiées dans les zones étudiées : le rat géant (*Cricetomys gambianus*), identifié dans les 3 zones et un petit mammifère insectivore de l'espèce *Crocidura olivieri*, retrouvé uniquement à Dakar et à Rufisque.

L'objectif initial de ce travail était de **caractériser génétiquement les souches de *T. gondii* qui circulent au Sénégal chez ces rongeurs** et petits mammifères dans des régions où l'on observe un assemblage d'espèces commensales constitué d'espèces invasives (*Mus musculus domesticus* et *Rattus rattus*) et d'espèces natives. La comparaison de la diversité de souches de *T. gondii* infectant les rongeurs invasifs et les espèces natives peut permettre d'évaluer dans quelle mesure les rongeurs invasifs contribuent à modifier la structure des populations de *T. gondii* au niveau des régions colonisées.

Pour pouvoir répondre à cet objectif, il fallait d'abord disposer d'un test permettant de discriminer de façon satisfaisante les rongeurs infectés par *T. gondii* de ceux qui ne le sont pas. Dans ce contexte, un des objectifs spécifiques de ce travail a été d'**évaluer la fiabilité du test sérologique d'agglutination modifié (MAT) dans la détection des infections chroniques par *T. gondii* chez les rongeurs**. En effet, du fait de la prévalence souvent faible de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs, il est nécessaire d'avoir à disposition des techniques de screening sérologique qui permettent de tester facilement un grand nombre d'échantillons. Une technique sérologique simple d'utilisation comme le MAT a l'avantage de permettre un tri aisé des échantillons pour identifier les individus infectés avant de passer à l'étape de la caractérisation génétique de la souche infectante. Il est également important que ces techniques puissent rapidement fournir des résultats s'il y a une volonté d'isoler les souches infectantes du fait de la baisse rapide de la viabilité du parasite dans les tissus d'un animal infecté après son euthanasie. Ce point est particulièrement critique quand des nombres importants d'échantillons frais doivent être traités durant un court laps de temps, comme à la suite d'une large campagne de captures de rongeurs sur plusieurs jours. Dans ce contexte, la détection moléculaire par PCR, malgré sa fiabilité, a l'inconvénient de nécessiter plusieurs étapes (extraction, amplification, révélation) qui nécessitent de mettre en place une logistique contraignante pour obtenir des résultats rapides, surtout dans le cadre de missions de terrain en zone tropicale où les équipements nécessaires à ce type

d'analyse ne sont pas toujours accessibles. De manière plus générale, la détection sérologique peut simplement être utile dans le cadre d'études épidémiologiques visant à estimer les niveaux de prévalence de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs ou petits mammifères. Plusieurs techniques sérologiques ont déjà été employées pour la détection de l'infection par *T. gondii* chez les rongeurs, mais aucune n'a été validée par un test Gold standard chez ce type d'hôtes. Le test sérologique le plus couramment utilisé est le test d'agglutination modifiée (MAT), rapide, et facile à effectuer sur le terrain. Cependant, ce test ne semble pas donner des résultats fiables pour toutes les espèces notamment de mammifères (Aroussi et al., 2015) comme il était admis auparavant. Chez les rongeurs, plusieurs cas d'infection confirmée ont été trouvés négatifs par sérologie MAT dans un certain nombre d'études (Dubey et al., 1995b ; Owen et Trees, 1998 ; Araújo et al., 2010 ; Gotteland et al., 2014). Il apparaît donc indispensable de valider les résultats de la sérologie par MAT pour chaque espèce séparément.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons pu avoir accès à deux types de prélèvements effectués sur ces rongeurs : du sérum pour la sérologie par MAT et des cerveaux pour la détection par qPCR de l'infection chronique par *T. gondii* et la caractérisation génétique des souches infectantes. Ces prélèvements ont été stockés à Dakar à - 20°C dans les locaux du CBGP, au fur et mesure de l'avancée du travail de terrain, avant d'être acheminés vers la France pour être analysés à Limoges dans notre laboratoire.

Dans cette étude, la concordance des résultats de la sérologie par MAT avec ceux de la qPCR a été évaluée pour chaque espèce de petit mammifère. La prévalence de l'infection par *T. gondii* a été évaluée pour chaque espèce et les différences de prévalence interspécifiques ont été discutées d'un point de vue bio-environnemental. Les souches infectant ces petits mammifères ont été génotypées par l'analyse de 15 marqueurs microsatellites.

Cette étude a donné lieu à l'article suivant :

Article 2 : **Galal L**, Schares G, Stragier C, Vignoles P, Brouat C, Cuny T, Dubois C, Rohart T, Glodas C, Dardé ML, Kane M, Niang Y, Diallo M, Sow A, Aubert D, Hamidović A, Ajzenberg D, Mercier A. *Diversity of Toxoplasma gondii* strains shaped by commensal communities of small mammals. Accepté dans *International Journal for Parasitology*.

Diversity of *Toxoplasma gondii* strains shaped by commensal communities of small mammals

Lokman Galal ^{a*}, Gereon Schares ^b, Claire Stragier ^c, Philippe Vignoles ^a, Carine Brouat ^c, Thomas Cuny ^a, Camille Dubois ^a, Thao Rohart ^a, Clément Glodas ^a, Marie-Laure Dardé ^{a,d}, Mamadou Kane ^e, Youssoupha Niang ^e, Mamoudou Diallo ^e, Aliou Sow ^e, Dominique Aubert ^{f,g}, Azra Hamidović ^a, Daniel Ajzenberg ^a, and Aurélien Mercier ^{a,d}

^a INSERM UMR_S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges 87025, France

^b Friedrich-Loeffler-Institut, Institute of Epidemiology, 17493 Greifswald - Insel Riems, Germany

^c CBGP, IRD, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Univ. Montpellier, 755 avenue du campus Agropolis, 34988 Montferrier-sur-Lez, Cedex, France

^d Centre National de Référence Toxoplasmose/*Toxoplasma* Biological Resource Center, CHU Limoges, 87042 Limoges, France

^e BIOPASS, CBGP-IRD, ISRA, UCAD, Campus de Bel-Air, BP 1386, Dakar, CP 18524, Senegal

^f EA7510 ESCAPE, UFR Medecine, University of Reims Champagne Ardenne, Reims, France

^g Laboratory of Parasitology, National Reference Centre on Toxoplasmosis, Hospital Maison Blanche, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Reims, France

*Corresponding author

Lokman Galal

INSERM UMR_S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges 87025, France

Tel: +33 (0) 5 19 56 42 64

Fax: +33 (0) 5 55 43 58 21

E-mail: lokmanmagalal@gmail.com

Abstract

Commensal rodent species are key reservoirs for *Toxoplasma gondii* in the domestic environment. In rodents, different *T. gondii* strains show variable patterns of virulence according to host species. *Toxoplasma gondii* strains causing non-lethal chronic infections in local hosts will be more likely to persist in a given environment, but few studies have addressed the possible role of these interactions in shaping the *T. gondii* population structure. In addition, the absence of validated techniques for upstream detection of *T. gondii* chronic infection in wild rodents hinders exploration of this issue in natural conditions. In this study, we took advantage of an extensive survey of commensal small mammals in three coastal localities of Senegal, with a species assemblage constituted of both native African species and invasive species. We tested 828 individuals for *T. gondii* chronic infection using the modified agglutination test (MAT) for antibody detection in serum samples and a qPCR assay for detection of *T. gondii* DNA in brain samples. The infecting *T. gondii* strains were genotyped whenever possible by the analysis of 15 microsatellite markers. We found (1) a very poor concordance between molecular detection and serology in the invasive house mouse, (2) significantly different levels of prevalence by species and (3) the autochthonous *T. gondii* Africa 1 lineage strains, which are lethal for laboratory mice, only in the native African species of commensal small mammals. Overall, this study highlights the need to reconsider the use of MAT serology in natural populations of house mice and provides the first data about *T. gondii* genetic diversity in invasive and native species of small mammals from Africa. In light of these results, we discuss the role of invasive and native species, with their variable adaptations to different *T. gondii* strains, in shaping the spatial structure of *T. gondii* genetic diversity in Africa.

Keywords

Toxoplasma gondii, *Hammondia*, *Neospora caninum*, Genetic diversity, Rodents, West Africa

1. Introduction

Toxoplasmosis is a ubiquitous parasitic zoonosis, caused by the obligate intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Felids are the definitive hosts, while all other warm-blooded animals are intermediate hosts for this parasite. Birds and mammals, including humans, develop dormant tissue cysts after ingestion of oocysts shed in the environment by cats in the form of contaminated feces. Another source of infection for human and other meat-consuming species is raw or undercooked meat of animals harboring infective tissue cysts. In the domestic environment, rodents are believed to be the most important intermediate hosts in the *T. gondii* cycle (Dubey et al., 1995b; Hejlíček et al., 1997) as they are usually the main prey species of domestic cats (Langham, 1990; Molsher et al., 1999; Turner and Bateson, 2013). However, while certain rodent species demonstrate resistance to a number of more or less virulent strains and develop lifelong chronic infection to *T. gondii* (Lilue et al., 2013; Dubey et al., 2016), other rodent species show a high susceptibility to most *T. gondii* strains and rapidly die from acute toxoplasmosis (Fujii et al., 1983; Jokelainen and Nylund, 2012). Hence, the patterns of genetic resistance specific to the local rodent species will determine *T. gondii* strains transmission in a given environment, and this mechanism might strongly shape the different *T. gondii* population structures observed around the world (Khan et al., 2009; Lilue et al., 2013). Strains that are able to persistently infect local rodent species according to their respective resistance patterns may represent at least partially those that are involved in local transmission to cats, contamination of the environment and infection of humans (Lilue et al., 2013). In Africa, which was the focus of our study, human infection mainly occurs from local sources, often due to the contact with a contaminated soil (Duong et al., 1992; Adou-Bryn et al., 2004; Uneke et al., 2007; Abu et al., 2015). Therefore, assessing *T. gondii* circulation among rodents and characterizing the strains causing chronic infection in these intermediate hosts could be of importance in order to determine which species are the local reservoirs of potentially pathogenic strains. Screening of rodents for *T. gondii* is useful to estimate the prevalence of *T. gondii* infection, but also to identify the chronically infected individuals before performing bioassay and isolating the infecting strain or to directly genotype it. Serological screening has been widely used in rodents mainly in the frame of prevalence studies. However, serological techniques have never been validated by a gold standard technique, which questions their reliability to identify infected individuals (summarized by Afonso et al., 2007; Dabritz et al., 2008; Mercier et al., 2013). The most commonly used serological test is the modified agglutination test (MAT). However, this test does not give reliable results for all species (Aroussi et al., 2015). In the present study, we took advantage of an extensive survey of commensal small mammals in three Coastal urban settlements of Senegal. Species assemblages of small mammals in those regions were composed of native African species (the giant pouch rat *Cricetomys gambianus* and the shrew *Crocidura olivieri*) and of invasive species (the house mouse *Mus musculus domesticus* and the black rat *Rattus rattus*) that were introduced during colonial times. Given their distinct origins, invasive and native species have been probably exposed to different *T. gondii* strains during their evolutionary history. In addition, the probable differences in the history of establishment of the domestic cat according to regions, beside the geographical variability of the climate (which influences the viability of oocysts in the environment), have probably exposed these intermediate hosts to varying levels of environmental contamination by *T. gondii*. These putative differences in the evolutionary history of invasive and African native small mammals may have led to distinct host-parasite co-adaptations. Hence, we hypothesize that invasive and native species would

exhibit different patterns of immune response to *T. gondii* infection associated to different innate susceptibilities to various *T. gondii* strains.

The sampling conducted during trapping sessions allowed the collection of sera and brain samples from four species of small mammals sampled in these three regions. As a first step, we compared antibody detection using MAT serology to the detection of *T. gondii* DNA in brain samples using a qPCR assay for each small mammal species. In addition, we discussed the differences of *T. gondii* prevalence level between each species based on the bioecological traits that characterize them. Finally, we genotyped strains from infected individuals. Identifying different strains in invasive and native African species of small mammals would support the hypothesis that different host species might be reservoirs for distinct *T. gondii* strains. The expected results of this study would be that rodent invasions are key events in shaping the *T. gondii* population structure in a given area.

2. Materials and methods

2.1. Small mammals sampling

Fieldwork was carried out under the framework agreements established between the Institut de Recherche pour le Développement and the Republic of the Senegal, as well as with the Senegalese Head Office of Waters and Forests, and the ministry of health and of the social action. Handling procedures were performed under our lab agreement for experiments on wild animals (no. D-34-169-1), and follow the official guidelines of the American Society of Mammalogists (Sikes and Gannon, 2011). Trapping campaigns within districts were systematically performed with prior explicit agreement from relevant local authorities. Small mammals were sampled by live trapping in 12 districts of the city of Dakar, in the international port of Dakar and in the Goree island, in 4 districts in Joal-Fadiouth and 2 districts in Rufisque according to a standardized protocol described by Dalecky et al. (2015). The primary aims of these sampling was to describe small mammal communities in these urban areas and the population genetic structure of the dominant species. In each district, we conducted one live trapping session of 2 to 5 consecutive days between 2016 and 2017, on a median surface of 0.04 km² (min: 0.01, max: 1.51). In general, two traps (one wire-meshed trap and one Sherman trap) were set per room or courtyard in buildings corresponding to dwelling houses, boutiques, workshops, offices or warehouses, and whose location was precisely recorded with a GPS device. Small mammals were brought back to our laboratory and euthanized by cervical dislocation before autopsy. For this study, blood samples were collected from the heart or from blood clot within the thoracic cavity, and then centrifuged to separate the serum. The brain of each rodent was also collected and weighted. In total 828 small mammals were included in the present screening for *T. gondii* infection within the 3 study zones: 671 *Mus musculus domesticus*, 78 *Rattus rattus*, 47 *Cricetomys gambianus*, and 32 *Crocidura olivieri* (shrews) (Figure 1).

2.2. Seroprevalence, molecular prevalence and comparison of MAT serology to qPCR

2.2.1. Serological examination

Sera were transferred to microtubes and stored at -20 °C until serological analyses. Sera of rodents and shrews were screened for *T. gondii* specific IgG antibodies (Dubey and Desmonts, 1987) following a slightly modified previously published protocol (Bolais et al., 2017) using four serial dilutions (1:20, 1:40, 1:100 and 1:800) of the serum. The antigen

consisting of formalin fixed RH strain tachyzoites was provided by the Laboratory of Parasitology, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Reims, France.

2.2.2. *T. gondii* DNA detection

After being rinsed in physiological serum (NaCl 0.9%), brains were placed in 1 ml physiological serum, and extruded through a 2-inch 23-gauge needle several times to yield a liquid tissue homogenate. Given that the qPCR method used is able to detect *T. gondii* DNA extracted from a single cyst, homogenization was performed to optimize *T. gondii* DNA detection in the case of a non-random tissue-cysts distribution in the brain. In highly resistant *T. gondii* host such as rats, the number of cysts in the brain of infected individuals is generally in the order of tens to thousands (Dubey, 1996; Freyre et al., 2001, 2003). In our case, DNA was extracted from 200 µl of liquid brain homogenate following the protocol designed for biological fluids processing using a commercial kit (Qiagen QIAamp DNA Mini Kit, Courtaboeuf, France), as recommended by the manufacturer. This proportion represents 15% to 20% of the total brain volume for most of the samples and makes it likely to detect *T. gondii* DNA in brains with very low tissue-cyst numbers. We calculated that there was a probability of 90% that at least one cyst should occur in the 200 µl of liquid homogenate if the whole brain contained 15 cysts or more (data not shown). The extraction products were tested by a qPCR assay as described by Ajzenberg et al. (2016) on a thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), targeting the 529 bp repeat region (REP529, GenBank accession no. AF146527) of *T. gondii* DNA (Homan et al., 2000).

In brief, each PCR reaction contained 5 µl of extracted DNA, mixed with 15 µl of a PCR mix with 1X LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes kit (Roche diagnostics, Mannheim, Germany), 0.5 U of UDG (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 5 mmol/L of MgCl₂, 0.5 µmol/L of each primer, 0.1 µmol/L of TaqMan probe which is labeled with a fluorescent dye (6-carboxyfluorescein, 6-FAM) at 5' end and a dark quencher (Black Hole Quencher, BHQ1) at the 3' end. The cycling protocol was as follows: initial decontamination by UDG at 50 °C for 2 min and denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles at 95 °C for 20 s and 60 °C for 40 s. The results obtained were expressed in cycle threshold (C_t) values. Each sample was run in duplicate and extraction products that were positive in at least one test were considered positive.

2.2.3. Assessment of the specificity of MAT and qPCR results

To assess whether positive results obtained by MAT serology could have been caused by infections with the *T. gondii*-related species *Hammondia hammondi*, *Hammondia heydorni* and *Neospora caninum*, all seropositive individuals were tested by three different PCR assays on brain DNA extracts using primers specifically targeting each of those three organisms. Also, the occurrence of possible cross reactions between the primers targeting the *Toxoplasma* 529 bp repeat region and *H. hammondi* or *H. heydorni* was verified by performing two different PCR assays on each positive brain sample for *T. gondii* using the primers specifically targeting *H. hammondi* and *H. heydorni*.

For the detection of *H. hammondi*, the primer pair Hham34F/Hham3R was used (Schaes et al., 2008). Briefly, PCR was carried out in a 25 µl reaction mixture consisting of 1U/25µl of Dynazyme II F-501L DNA polymerase (Finzyme, Espoo, Finland), of 250 µM of each of the dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway, USA), 0.5 µM of each primer and 2 µl of DNA. The thermal cycling protocol followed included an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 60°C for 1 min, 72°C for 1 min and 94°C for 1 min. The PCR ended with incubation at 60°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. The amplification

products were resolved in 1.5% agarose gels using a 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) as reference.

For the detection of *H. heydorni*, the primer pair JS4/JS5 (Slapeta et al., 2002) was used. In brief, a final reaction volume of 25 µl was applied, composed of 1U/25µl of Dynazyme II F-501L DNA polymerase (Finzyme, Espoo, Finland), of 250 µM of each of the dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway, USA), 0.5 µM of each primer and 2 µl of DNA. Cycling conditions were: 5 min at 94.8 °C (initial denaturation); 1 min at 56 °C (including a 0.5 °C decrement per cycle after the first), 1 min at 72 °C, and 1 min at 94 °C (10 cycles); 1 min at 51 °C, 1 min at 72 °C, and 1 min at 94 °C (40 cycles); and 5 min at 72 °C (final elongation). The amplicons were analysed in 1.5% agarose gels using a 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) as reference.

For the detection of *N. caninum*, DNA was analysed by a previously published qPCR targeting the Nc-5 gene by using the primer pair NeoF/NeoR and the probe Neo-probe as described previously (Constantin et al., 2011; Legnani et al., 2016). Briefly, qPCR reactions were performed on a CFX96 instrument (Bio-Rad Laboratories) in a final volume of 20 µl, using a commercial master mix (iQ supermix, Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany). qPCR primers (800 nM) and a probe (200 nM) were employed as reported (Legnani et al., 2016). The cycling conditions were 95 °C for 5 min, followed by 46 amplification cycles of 95 °C for 10 s and 58 °C for 30 s as described. After each cycle the light emission by the fluorophore was measured. qPCR results were analysed using the CFX manager software Version 1.6 (Bio-Rad Laboratories).

2.2.4. Prevalence of *T. gondii* infection

Toxoplasma gondii infection prevalence levels were defined on the basis of molecular detection of *T. gondii* using qPCR and on the results of MAT serology (positive cut-off at 1:20 dilution titer). The occurrence of a species-effect on the prevalence levels was tested by Fisher's exact test, adopting a 95% confidence interval.

2.2.5. Level of agreement between tests

For each species of rodent or shrew, Kappa coefficient calculation was performed online (<http://graphpad.com/quickcalcs/kappa2/>) and used to estimate agreement between the two tests for the detection of *T. gondii* infection. The Kappa coefficient values (k) were classified according to the benchmark scale (Landis and Koch, 1977). The extent of agreement was qualified as very poor ($0 < k < 0.20$), poor ($0.20 < k < 0.40$), moderate ($0.40 < k < 0.60$), good ($0.60 < k < 0.80$), and almost perfect ($0.80 < k < 1$) depending on the magnitude of Kappa. A Kappa value below 0 was qualified as being a disagreement.

2.3. Genotyping of *T. gondii* strains and neighbor-joining clustering

To characterize the infecting *T. gondii* strains in the different species of rodents and shrews, *T. gondii*-positive DNA samples with a C_t value ≤ 32 by qPCR were genotyped using the length polymorphism of 15 microsatellite markers located on 11 different chromosomes in a multiplex PCR assay described elsewhere (Ajzenberg et al., 2010).

Reference strains representing the 16 *T. gondii* haplogroups (HG) described to date (Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016) were used for comparison with the new small mammals isolates: GT1 (HG1), ME49 (HG2), VEG (HG3), MAS (HG4), RUB (HG5), FOU (HG6), CAST (HG7), TgCtBr5 (HG8), P89 (HG9), VAND (HG10), COUG (HG11), ARI (HG12), TgCtPRC04 (HG13), TgA105004 (HG14), TgCtCo5 (HG15) and CASTELLS (HG16). In addition, a

number of field isolates from Algeria (Yekkour et al., 2017), Ethiopia (Gebremedhin et al., 2014), and Gabon (Mercier et al., 2010) were included for comparison with other African strains.

To evaluate the extent of genetic distance among Senegalese strains from our sample and evaluate their position towards the reference strains mentioned above, an unrooted Neighbor-joining tree was reconstructed from microsatellite data with Populations 1.2.32 (<http://bioinformatics.org/populations/>) based on Cavalli-Sforza and Edwards chord distance estimator (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) and generated with MEGA 6.05 (<http://www.megasoftware.net/history.php>).

3. Results

3.1. Different *T. gondii* seroprevalence and molecular prevalence levels according to small mammal host species

We detected no DNA of *Hammondia hammondi*, *Hammondia heydorni* or *Neospora caninum* in the brains of all seropositive individuals by MAT (n=61). In qPCR positive brains for *T. gondii* (n=110), only two gave positive PCR results for *H. heydorni*.

Estimates of *T. gondii* prevalence varied from 2.6% to 37.5% by MAT serology and from 3.8% to 27.7% by qPCR, depending on the species of small mammals (Table 1). Seroprevalence and molecular prevalence levels were both significantly different between species ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively).

3.2. Different levels of agreement between MAT and qPCR for detecting *T. gondii* infection according to small mammal host species

For *M. m. domesticus*, the larger sample size (n=671) allowed a robust comparison of the results with both techniques (Table 1). From the 113 individuals positive with at least one of the two techniques, 24 individuals were MAT positive and qPCR negative, 81 were MAT negative and qPCR positive and only eight were positive with both techniques. Accordingly, MAT and qPCR results demonstrated very poor agreement with a Kappa of 0.067 [95% CI: -0.017; 0.150].

For *R. rattus*, a limited sample size (n=78) and a low prevalence did not allow a robust estimation of the concordance between MAT and qPCR. However, a noteworthy observation is that the only 2 rats with MAT titers ≥ 20 were negative using qPCR and the only 3 qPCR positive individuals had MAT titers < 20 . This observation was confirmed by the disagreement between the results of the 2 techniques shown by kappa coefficient calculation of -0.032 [95% CI: -0.062; -0.002].

For *C. gambianus*, the Kappa coefficient value showed a good agreement between both tests (0.695 [95% CI: 0.471; 0.920]), although it lacked accuracy as its confidence interval ranged from moderate to almost perfect agreement categories.

For *C. olivieri*, the Kappa coefficient value (0.472 [95% CI: 0.178; 0.765]) lacked accuracy and was considered as non-informative due to the limited size of the available sample. All the PCR-positive individuals from this species (n=5) were seropositive. However, 7 individuals positive in MAT that were PCR-negative were also observed.

3.3. Identification of the *T. gondii* lineage *Africa 1* only in native African small mammal host species

Most of the small mammals detected as infected by qPCR displayed a too low burden of *T. gondii* in their brains to allow genotyping (Supplementary Figure S1). Out of the 110 brain samples qPCR positive for *T. gondii*, genotyping with 15 microsatellite markers was attempted for only 16 DNA samples (19.4%) which had a C_i value ≤ 32 . In total, 11 DNA samples were successfully amplified at all the 15 microsatellites, one DNA sample was successfully amplified for 11 microsatellites and 4 DNA samples were not amplified at all (Supplementary Table S1). The proportion of the successfully genotyped samples among the qPCR positive samples varied between the different species. Among the 12 obtained genotypes, none was from the 3 qPCR positive *R. rattus*, 6 genotypes were from the 89 qPCR positive *M. m. domesticus* (6.7%), one genotype was from the 5 qPCR positive *C. olivieri* (20%) and 5 genotypes were from the 13 qPCR positive *C. gambianus* (38.5%). The neighbor-joining tree (Figure 2) showed that 11 out of 12 genotypes could be clustered in three main groups: a group clustering type II strains (6/12), a group clustering Type III strains (3/12), and a group clustering *Africa 1* strains (2/12). In addition, one atypical genotype clustered with the genotype of an African strain TgCkGh01 from Ghana. The six successfully genotyped strains infecting *M. m. domesticus* clustered only with type II (4/6) and type III (2/6) strains whereas the five genotyped strains infecting *C. gambianus* clustered with the three main groups and with the Ghanaian TgCkGh01 strain. The unique strain characterized in *C. olivieri* clustered with *Africa 1* strains. No mixed strain infection was found. Among those 12 genotyped individuals, 10 were seropositive and showed high antibody titers (seropositive at 1:100 and 1:800 dilutions titers). The only two strains from seronegative individuals were found in *M. m. domesticus*.

4. Discussion

Testing the hypothesis of different adaptation patterns to *T. gondii* strains according to small mammal host species in natural conditions implies dealing with several obstacles. The levels of prevalence which are often low in this category of intermediate hosts (Gotteland et al., 2014) and the absence of validated techniques for detecting chronic *T. gondii* carriers among natural populations of rodents make it difficult to isolate the parasite or its DNA in sufficient amounts for genotyping purposes. Here, we show that the agreement level between MAT serology and qPCR results varies substantially according to species. We found a poor agreement between MAT serology and qPCR results in *M. m. domesticus*, with a high proportion of PCR-positive individuals not detected by MAT serology. The same result was found in *R. rattus*, although a larger sampling is required to draw a robust conclusion. At the opposite, the good agreement between the two tests in *C. gambianus* suggests that MAT serology can be useful for the detection of *T. gondii* infection in this species, but needs confirmation on a larger sample. For *C. olivieri*, the limited number of tested individuals did not allow to draw a clear conclusion about the concordance between the two tests concerning this species.

In *M. m. domesticus*, the large proportion of PCR-positive individuals found negative by MAT serology indicates that MAT serology is not a reliable test to detect chronic infection among natural populations of this species. This is not consistent with results obtained in conventional laboratory strains of mice (Dubey et al., 1995a; Owen and Trees, 1998), and emphasizes the need to validate MAT serological tests in natural rodent populations. Our results, based on an extensive sampling, confirm previous observations of true infection in wild mice found to be negative by MAT serology (Dubey et al., 1995b; Owen and Trees, 1998; Araújo et al., 2010; Gotteland et al., 2014). In the present study, to further confirm that PCR-positive individuals were infected by *T. gondii*, we took into account the possible weak

cross-reactivity of the primers targeting the *Toxoplasma* 529 bp repeat region with *Hammondia* DNA as it was reported in a previous study (Schaes et al., 2008). Only two of the *T. gondii* PCR-positive individuals (n=110) were found to be positive for *H. heydorni*. We could not conclude whether only *H. heydorni* DNA was occurring in brain extracts of these two individuals or whether both *T. gondii* and *H. heydorni* DNA were present, but this result confirms the good specificity of the qPCR in detecting *T. gondii* DNA in our sample. High proportions of chronically infected individuals with undetectable levels of anti-*T. gondii* antibodies cannot be solely explained by cases of recent infections in which humoral response may not have developed yet. A number of studies have noticed that the titer of antibodies in sera of infected hosts may more or less strongly correlate with the parasitic burden in tissues (Opsteegh et al., 2010; Singh et al., 2010). Most of the infected individuals exhibited very low concentrations of *T. gondii* DNA in their brains, which may have led to low antibody titer in sera that are undetectable by MAT serology. Also, Beverley (1959) demonstrated that congenitally infected outbred mice did not develop levels of antibodies that are detectable by serology, an observation later confirmed by Jacobs (1966). Furthermore, experimental co-infections of laboratory mice by *T. gondii* and other parasitic microorganisms showed the occurrence of complex interactions between the different host immune pathways for the control of these unrelated parasitic infections (Welter et al., 2006; Khan et al., 2008). Unlike laboratory rodents, natural populations of rodents are reservoirs of important parasitic populations (Brouat et al., 2007; Diagne et al., 2017)(Brouat et al., 2007; Diagne et al., 2017). The occurrence of complex interactions between the host immune response pathways for dealing with this diversity of parasitic species could be reasonably expected. Notably, *T. gondii* was shown to inhibit the antigen-specific Th2 immune responses against a number of parasitic species (Santiago et al., 1999; Liesenfeld et al., 2004; Miller et al., 2009; Ahmed et al., 2017) Although no study has shown the reverse, inhibitions of immune responses related to coinfections that may be common in natural populations of rodents could work against serological detection.

In addition, variable proportions of seropositive individuals that were negative using qPCR were noted in our sample for all the 4 studied species. Serological cross-reactions between the *T. gondii* antigen used in MAT serology and antibodies against the cyst-forming coccidians *Hammondia hammondi*, *Hammondia heydorni* and *Neospora caninum* (summarized by Gondim et al., 2017) are unlikely, because PCR assays for the detection of these organisms in the brain extracts of seropositive individuals yielded negative results in all individuals. However, for *Hammondia* spp., the brain is not the predilection site of infection (Frenkel and Dubey, 1975) and checking for *Hammondia* DNA in muscles may have led to slightly different conclusions. Unfortunately, no muscle tissues could be tested in this study. Another explanation could be the occurrence of unspecific agglutination reactions, which is a recurring problem in agglutination tests (Dubey et al., 1985; Weinberg and Storch, 1985; Becker et al., 2007; Schaes et al., 2018). This phenomenon may be caused by the high protein concentrations that could be found in some samples (Le Potier et al., 1998; Villena et al., 2012). It is noteworthy that the proportion of MAT-positive/qPCR-negative individuals in our sample was lower in the higher categories of dilution titers, which could be attributed to the decrease in protein concentrations by increasing the dilution of tested serum samples. Finally, the occurrence of truly infected individuals that go undetected by PCR cannot be fully excluded. If an infected seropositive animal has a low tissue burden and an inhomogeneous cyst distribution in its tissues, the tissue sample collected for the DNA extraction could be free from *T. gondii* cysts (Opsteegh et al., 2011; Aroussi et al., 2015). In most species, neural and muscular tissues usually harbor the highest burden of tissue cysts, with the brain being

the predilection site of *T. gondii* in mice (Dubey, 2009). This latter statement needs to be confirmed in other species of rodents. Dubey et al. (2016) have summarized the results from studies investigating the distribution of tissue cysts in the brain of various laboratory lineages of rats and mice. The majority of the studies reported a non-random distribution of tissue-cysts across the different brain areas, although it was not obvious. Even though precautions were taken to optimize detection (see Material and Methods), we cannot fully exclude the occurrence of a negative qPCR result in infected brains in which the cysts count was extremely low. To our knowledge, such low numbers of cysts (< 10 cysts per brain) have never been reported in brains of rodents. This issue could be of key importance in *T. gondii* cycle as a single viable bradyzoite is enough for cat infection (Dubey, 2006). Altogether, this discussion has emphasized on the clear limitations of MAT serology in detecting chronic *T. gondii* infection compared to qPCR in natural populations of *M. m. domesticus*, but defining the latter as a gold standard test for the detection of *T. gondii* in chronically infected rodents requires further study.

We found statistically significant differences in prevalence levels between the four species studied here, by the calculation of both seroprevalence and molecular prevalence. Given the important limits of MAT serology that we highlighted above, we only considered the results of molecular prevalence in the interpretations of our results. The differences in molecular prevalence according to small mammal host species reported in this study were in accordance with the biology and the life habits of each species. *Cricetomys gambianus* had the highest prevalence level (27.7%) compared to the three other species. In captivity, this species has the longest lifespan (more than four years - up to eight years in the closely related *Cricetomys ansorgei* from Southern Africa (Goodman and Monadjem 2017)), compared to the three other species (from 12-18 months in the wild to four years in captivity for *Crocidura* species (Nowak, 1999); around one year under natural conditions for *Mus musculus domesticus* and *R. rattus* (Berry and Bronson, 1992; Pocock Michael et al., 2004; Wilson, 2009)). *Cricetomys gambianus* should also have the widest home range (*C. ansorgei* has been shown to have a home range of several hectares (Skinner and Smithers, 1990)). These bioecological traits may multiply the likelihood of contact with oocysts in time and space. Ecological characteristics may also be invoked to explain differences in prevalence levels between *Crocidura olivieri* (15.6%), *M. m. domesticus* (13.3%) or *R. rattus* (3.8%). For instance, *Crocidura* species could have a higher likelihood of contact with oocysts in soils by frequent digging and eat paratenic hosts of *T. gondii* like earthworms (Clausnitzer et al., 2003; Churchfield et al., 2004). Hence, higher levels of *T. gondii* prevalence have been found by Afonso et al. (2007) in fossorial species compared to other rodent species. Conversely, the arboreal species *R. rattus* that often builds nests in roofs of houses could have limited contact with the soil. Relying prevalence patterns with these species characteristics makes the hypothesis of an orally acquired infection for these species and an environmental source of infection. This interpretation scheme, which has been used in a number of previous studies (Afonso et al., 2007; Reperant et al., 2009), should however be taken with caution because the main mode of transmission of *T. gondii* in natural populations of small mammals is still unresolved (Dubey, 2009). High levels of prevalence have been reported in *M. m. domesticus* (Murphy et al., 2008) and *Apodemus sylvaticus* (Thomasson et al., 2011) in areas relatively free of cats. These previous studies suggest a *T. gondii* cycle perpetuation only through congenital transmission between the successive generations of rodents, although the use of nested-PCR in these studies is methodologically questionable because of possible PCR cross-contamination issues.

The outcome of *T. gondii* infection according to the virulence of the infecting strain and the host resistance may also shape the pattern of infection prevalence in rodents. Indeed, higher levels of prevalence are expected in species that survive to infection by most of *T. gondii* strains. In our sample, genotypic diversity of *T. gondii* strains identified in rodents and shrews consisted mainly of clonal lineages of type II (6/12), type III (3/12) and *Africa 1* (2/12) lineages. This diversity is consistent with the intertropical position of Senegal in West Africa, type II strains being predominant in North Africa and *Africa 1* strains in the tropical countries of West Africa (e.g., Guinea, Ghana and Côte D'Ivoire) (Galal et al., 2017). Due to the low parasite burden in most samples, the limited number of successfully genotyped *T. gondii* strains did not allow a robust comparison of strain diversity according to the host species. The five genotyped strains infecting *C. gambianus* showed a substantial diversity for such a small sample size as they were represented in four different groups in the neighbor-joining tree. The identification of the *Africa 1* lineage in the two native African species *C. gambianus* and *C. olivieri* shows that these species are resistant to *T. gondii* strains with this genotype. *Africa 1* and type I strains are closely related (Mercier et al., 2010) and known to be lethal in all the conventional strains of laboratory mice (Khan et al., 2009; Mercier et al., 2010; Behnke et al., 2011). These strains harbor the type I alleles at the *ROP5* and *ROP18* genes, both known as major virulence determinants in laboratory mice (Shwab et al., 2016). The resistance of native host species to most of the African *T. gondii* strains including *Africa 1* can be expected as they have probably shared the same environment since ancient times and had co-adapted in a pattern allowing both parasite's transmission and host survival.

In the invasive species *M. m. domesticus*, only type II and type III strains were identified. Unlike laboratory mice that often develop high parasitic burdens following infection by *T. gondii* — and this is why they are commonly used in strain bioassays (Dubey, 2009) —, most wild mice in our sample had very low parasitic burdens in their brains to allow genotyping. Due to the small number of successfully genotyped strains, we could not determine if the absence of *Africa 1* strains in this species should be attributed to the limits of our sampling or to a virulence of *T. gondii* strains with this genotype in *M. m. domesticus* from Senegal, as it is the case for most laboratory mice strains. Historical and genetic evidence point to a European origin for the *M. m. domesticus* populations in Senegal (Dalecky et al., 2015; Lippens et al., 2017) that were introduced in port cities through ships of European explorers and settlers. In Europe, type II, followed by type III, which are not pathogenic for laboratory mice, are by far the predominant lineages. We speculate that mice may therefore be not adapted to the more virulent *T. gondii* strains found in Africa, a hypothesis previously proposed by Jensen et al. (2015). This may partly explain the higher prevalence of *T. gondii* infection in native species over invasive species, as the latter (at least *M. m. domesticus*) would die after the infection with certain African strains. The genes involved in *T. gondii* resistance in mice (the immunity regulated GTPases [IRGs]) show a high degree of polymorphism among natural mice populations (Lilue et al., 2013). This diversification of the alleles involved in *T. gondii* resistance may be driven by the virulence of strains specific to each region of the world. For example, the Southeastern Asian house mouse (*Mus musculus castaneus*) shows resistance to type I strains (Lilue et al., 2013) in Southeastern Asia, where type I and other genetically related strains are not uncommon (Chaichan et al., 2017). This subspecies of mice has been shown to inhibit the parasite-derived kinase complex ROP5/ROP18, a putative adaptive trait to survive infection by type I strains (Lilue et al., 2013).

In conclusion, the results presented here contribute to our understanding of the complex interactions that may occur between *T. gondii* and commensal small mammals in natural

conditions. Our results support the hypothesis of variable adaptations of commensal small mammal species to the different strains of the parasite and provide insight into the putative mechanisms shaping the spatial structure of *T. gondii* genetic diversity. Our findings also highlight the important discrepancies that could occur between laboratory mice and natural populations of mice regarding humoral response to *T. gondii* infection and parasite burdens in tissue of infected mice, which poses new challenges in detecting and characterizing the parasite in one of its most important reservoir species.

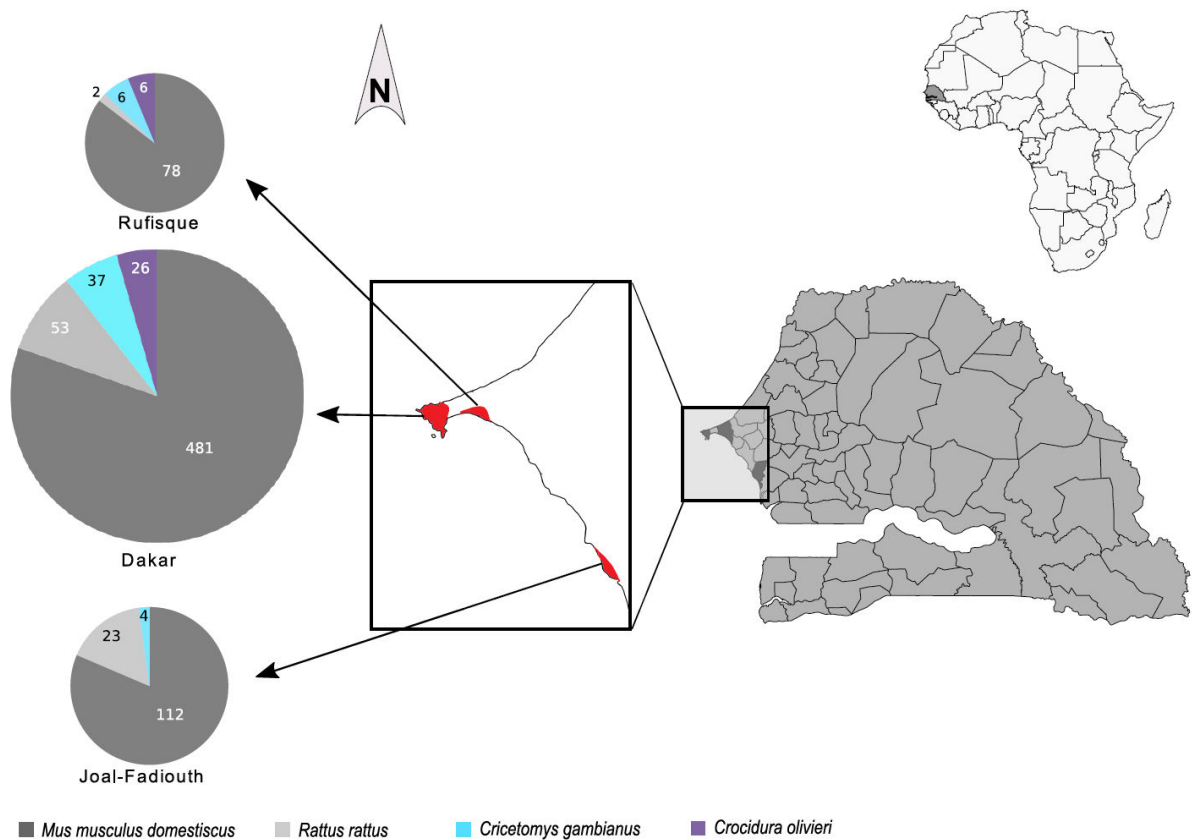


Figure 1. Sampling regions and the studied species of rodents and shrews.

The three studied regions of Senegal are colored in black. The pie charts indicate the number of rodents and shrews from each species that have been included in the present study (for details refer to Supplementary Fig. S1).

Species	<i>M. m. domesticus</i>	<i>R. rattus</i>	<i>C. gambianus</i>	<i>C. olivieri</i>
Sample size	671	78	47	32
Seroprevalence MAT % (CI at 95%)	4.8 (3.2; 6.4)	2.6 (-0.9; 6.1)	31.9 (18.6; 45.2)	37.5 (20.7; 54.3)
Molecular prevalence PCR % (CI at 95%)	13.3 (10.7; 15.9)	3.8 (-0.4; 8)	27.7 (14.9; 40.5)	15.6 (3.0; 28.2)
Kappa coefficient (CI at 95%)	0.067 (-0.017; 0.150)	-0.032 (-0.062; -0.002)	0.695 (0.471; 0.920)	0.472 (0.178; 0.765)
Kappa agreement	very low agreement	disagreement	good agreement	moderate agreement

Table 1. Prevalence of *T. gondii* infection in the sampled regions of Senegal and comparison of MAT serology vs. qPCR results in brain samples for each species.

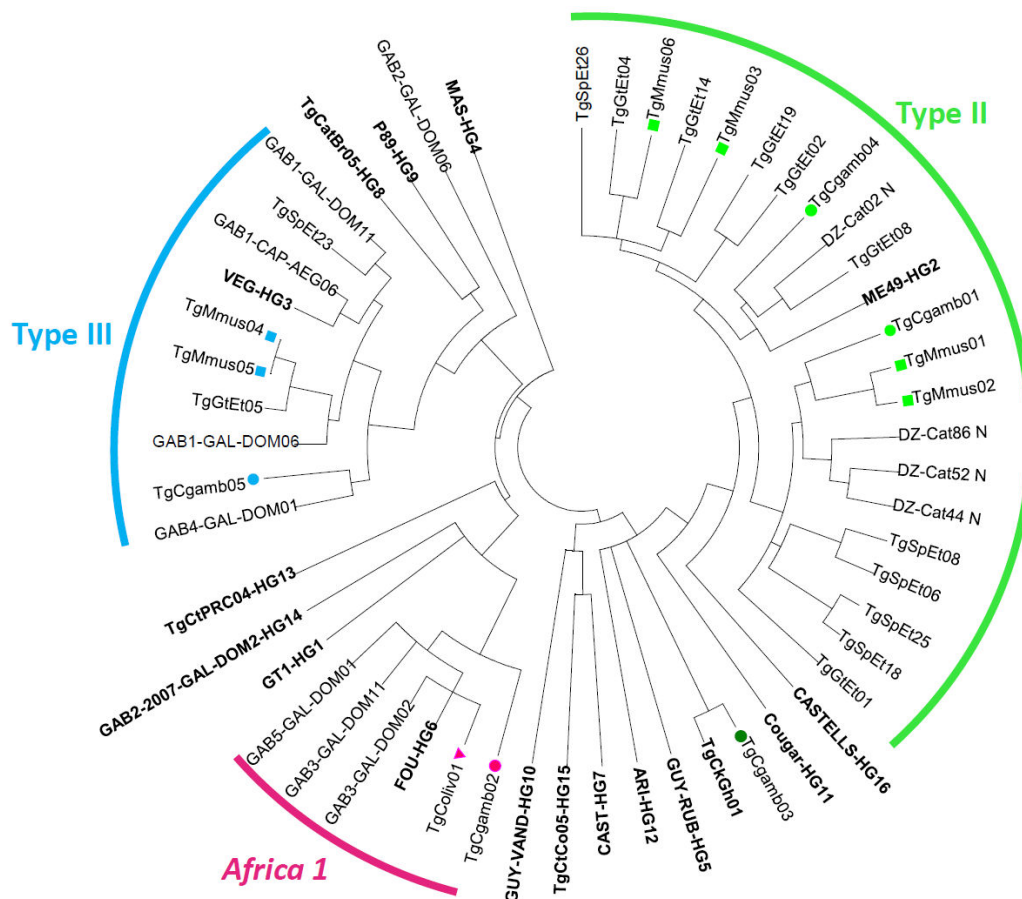


Figure 2. Neighbor-joining tree of genotypes inferred from Cavalli-Sforza distances calculated for the data of 15 microsatellite markers for the twelve strains described in this study and a set of reference strains. Circles next to the identifiers of genotypes indicate individuals belonging to *C. gambianus* species, squares indicate *Mus musculus* and triangles indicate *C. olivieri*. The lineages clustering genotypes from this study are indicated when available. Reference strains and their respective haplogroups (HG) are indicated in bold letters when available (for details refer to Supplementary Table S1).

Acknowledgments

We would like to thank Laurent Granjon and Jean-Marc Duplantier for sharing some samples, critical reading of previous versions of the manuscript, and helpful discussions. In addition, we thank Océane Maugrion, Susanne Zahnow and Mareen Sens for excellent technical assistance. We thank the French Agence Nationale de la Recherche (ANR project IntroTox 17-CE35-0004), the University of Limoges and the Nouvelle-Aquitaine region for funding this research.

References

- Abu, E.K., Boampong, J.N., Ayi, I., Ghartey-Kwansah, G., Afoakwah, R., Nsiah, P., Blay, E., 2015. Infection risk factors associated with seropositivity for *Toxoplasma gondii* in a population-based study in the Central Region, Ghana. *Epidemiol. Infect.* 143, 1904–1912.
- Adou-Bryn, K.D., Ouhon, J., Nemer, J., Yapou, C.G., Assoumou, A., 2004. [Serological survey of acquired toxoplasmosis in women of child-bearing age in Yopougon (Abidjan, Côte d'Ivoire)]. *Bull Soc Pathol Exot* 97, 345–348.
- Afonso, E., Poulle, M.-L., Lemoine, M., Villena, I., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., 2007. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in small mammals from the Ardennes region, France. *Folia Parasitol.* 54, 313–314.
- Ahmed, N., French, T., Rausch, S., Kühl, A., Hemminger, K., Dunay, I.R., Steinfeld, S., Hartmann, S., 2017. *Toxoplasma* Co-infection Prevents Th2 Differentiation and Leads to a Helminth-Specific Th1 Response. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 341.
- Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.-L., 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4641–4645.
- Ajzenberg, D., Lamaury, I., Demar, M., Vautrin, C., Cabié, A., Simon, S., Nicolas, M., Desbois-Nogard, N., Boukhari, R., Riahi, H., Dardé, M.-L., Massip, P., Dupon, M., Preux, P.-M., Labrunie, A., Boncoeur, M.-P., 2016. Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii*: A Prospective and Multicentric Study. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004790.
- Araújo, J.B., da Silva, A.V., Rosa, R.C., Mattei, R.J., da Silva, R.C., Richini-Pereira, V.B., Langoni, H., 2010. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. *Veterinary parasitology* 174, 328–331.
- Aroussi, A., Vignoles, P., Dalmay, F., Wimel, L., Dardé, M.-L., Mercier, A., Ajzenberg, D., 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. *Parasite* 22, 14.
- Becker, K., Almasri, A.S., von Eiff, C., Peters, G., Heilmann, C., Fegeler, W., 2007. Systematic Survey of Nonspecific Agglutination by *Candida* spp. in Latex Assays. *J Clin Microbiol* 45, 1315–1318.

- Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., Sibley, L.D., 2011. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9631–9636.
- Berry, R.J., Bronson, F.H., 1992. Life history and bioeconomy of the house mouse. *Biol Rev Camb Philos Soc* 67, 519–550.
- Beverley, J.K.A., 1959. Congenital Transmission of Toxoplasmosis through Successive Generations of Mice. *Nature* 183, 1348.
- Bolais, P.F., Vignoles, P., Pereira, P.F., Keim, R., Aroussi, A., Ismail, K., Dardé, M.-L., Amendoeira, M.R., Mercier, A., 2017. *Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. *Parasit Vectors* 10, 88.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19, 233–257.
- Chaichan, P., Mercier, A., Galal, L., Mahittikorn, A., Arie, F., Morand, S., Boumédiène, F., Udonsom, R., Hamidovic, A., Murat, J.B., Sukthana, Y., Dardé, M.L., 2017. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infect. Genet. Evol.* 53, 227–238.
- Churchfield, S., Barrière, P., Hutterer, R., Colyn, M., 2004. First results on the feeding ecology of sympatric shrews (Insectivora: Soricidae) in the Tai National Park, Ivory Coast. *Acta Theriol* 49, 1–15.
- Clausnitzer, V., Churchfield, S., Hutterer, R., 2003. Habitat occurrence and feeding ecology of *Crocidura montis* and *Lophuromys flavopunctatus* on Mt. Elgon, Uganda. *African Journal of Ecology* 41, 1–8.
- Constantin, E.-M., Schares, G., Grossmann, E., Sauter, K., Romig, T., Hartmann, S., 2011. [Studies on the role of the red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential definitive host of *Neospora caninum*]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 124, 148–153.
- Dabritz, H.A., Miller, M.A., Gardner, I.A., Packham, A.E., Atwill, E.R., Conrad, P.A., 2008. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in wild rodents from central coastal California and a review of *T. gondii* prevalence in rodents. *J. Parasitol.* 94, 675–683.
- Dalecky, A., Bâ, K., Piry, S., Lippens, C., Diagne, C.A., Kane, M., Sow, A., Diallo, M., Niang, Y., Konečný, A., Sarr, N., Artige, E., Charbonnel, N., Granjon, L., Duplantier, J.-M., Brouat, C., 2015. Range expansion of the invasive house mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: a synthesis of trapping data over three decades, 1983–2014. *Mammal Review* 45, 176–190.
- Dubey, J., 2009. *Toxoplasmosis in animals and humans*. Boca Raton: CRC Press.
- Dubey, J.P., 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.* 140, 69–75.
- Dubey, J.P., 1996. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *J. Parasitol.* 82, 951–956.
- Dubey, J.P., Desmots, G., 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J.* 19, 337–339.

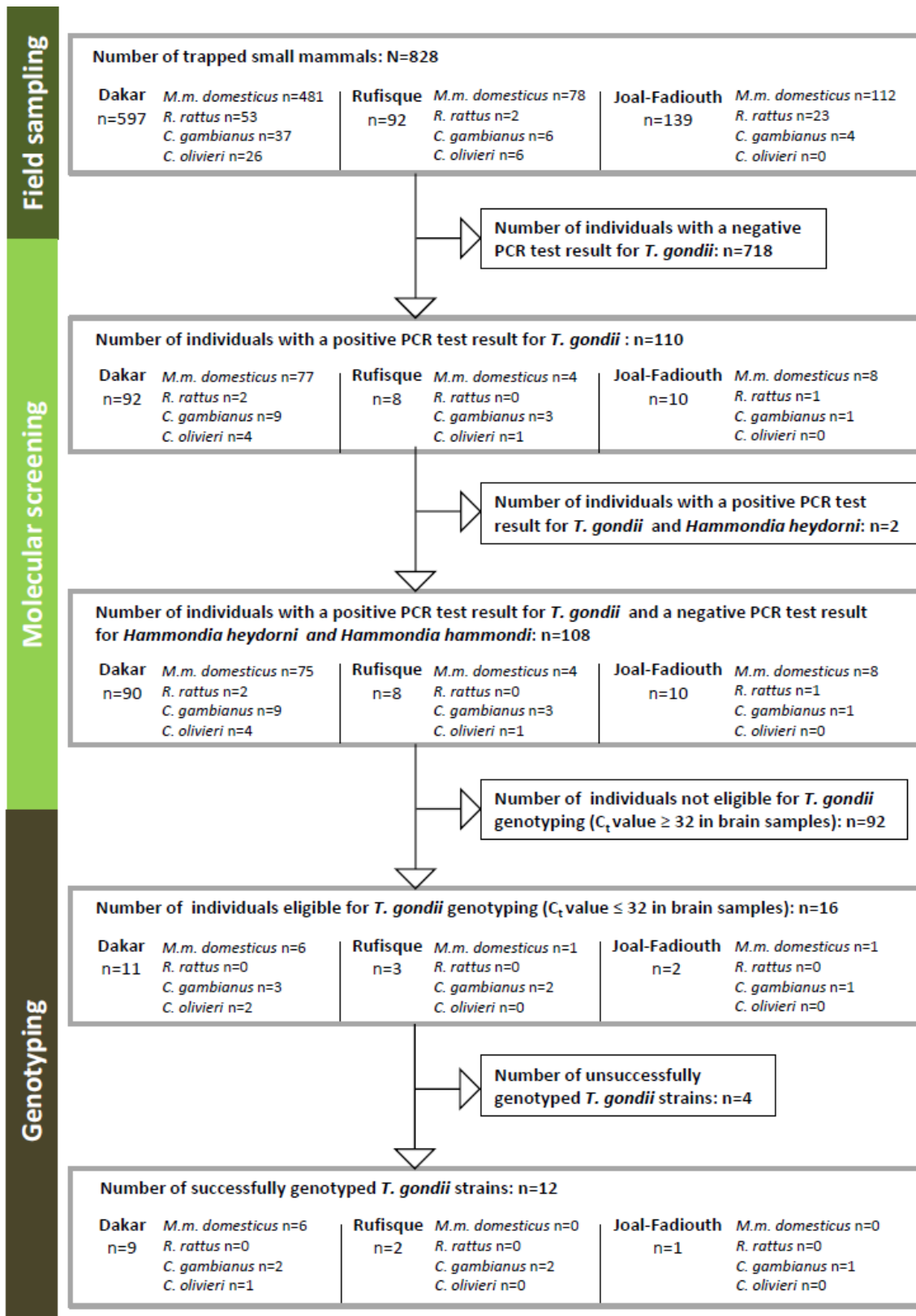
- Dubey, J.P., Desmonts, G., McDonald, C., Walls, K.W., 1985. Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1085–1088.
- Dubey, J.P., Ferreira, L.R., Alsaad, M., Verma, S.K., Alves, D.A., Holland, G.N., McConkey, G.A., 2016. Experimental Toxoplasmosis in Rats Induced Orally with Eleven Strains of *Toxoplasma gondii* of Seven Genotypes: Tissue Tropism, Tissue Cyst Size, Neural Lesions, Tissue Cyst Rupture without Reactivation, and Ocular Lesions. *PLoS ONE* 11, e0156255.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Powell, E.C., 1995a. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J. Parasitol.* 81, 48–53.
- 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., 1995b. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81, 723–729.
- Duong, T.H., Dufillot, D., Martz, M., Richard-Lenoble, D., Kombila, M., 1992. [Seroepidemiological study of toxoplasmosis in Libreville, Gabon]. *Ann Soc Belg Med Trop* 72, 289–293.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., 1975. *Hammondia hammondi* gen. nov., sp.nov., from domestic cats, a new coccidian related to *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. *Z Parasitenkd* 46, 3–12.
- Freyre, A., Falcón, J., Correa, O., Mendez, J., González, M., Venzal, J.M., 2001. Residual infection of 15 *Toxoplasma* strains in the brain of rats fed cysts. *Parasitol. Res.* 87, 915–918.
- Freyre, A., Falcón, J., Correa, O., Mendez, J., González, M., Venzal, J.M., Morgades, D., 2003. Cyst burden in the brains of Wistar rats fed *Toxoplasma* oocysts. *Parasitol. Res.* 89, 342–344.
- Fujii, H., Kamiyama, T., Hagiwara, T., 1983. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 36, 343–346.
- Galal, L., Ajzenberg, D., Hamidović, A., Durieux, M.-F., Dardé, M.-L., Mercier, A., 2017. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends Parasitol.*
- Gebremedhin, E.Z., Abdurahaman, M., Tessema, T.S., Tilahun, G., Cox, E., Goddeeris, B., Dorny, P., De Craeye, S., Dardé, M.-L., Ajzenberg, D., 2014. Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption. *Parasit Vectors* 7, 425.
- Gondim, L.F.P., Mineo, J.R., Schares, G., 2017. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology* 144, 851–868.
- Goodman, Monadjem, 2017. Handbook of the mammals of the world : vol. 7 : rodents II.
- Gotteland, C., Chaval, Y., Villena, I., Galan, M., Geers, R., Aubert, D., Poulle, M.-L., Charbonnel, N., Gilot-Fromont, E., 2014. Species or local environment, what

- determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? Parasitology 141, 259–268.
- Hejlíček, K., Literák, I., Nezval, J., 1997. Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. J. Wildl. Dis. 33, 480–485.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int. J. Parasitol. 30, 69–75.
- Jacobs, L., 1966. The occurrence of *Toxoplasma* infection in the absence of demonstrable antibodies, in: Proceedings of the First International Congress of Parasitology, Volume 1. Elsevier, pp. 176–177.
- Jensen, K.D.C., Camejo, A., Melo, M.B., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G.M., Frickel, E.-M., Ploegh, H.L., Young, L., Saeij, J.P.J., 2015. *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. MBio 6, e02280.
- Jokelainen, P., Nylund, M., 2012. Acute fatal toxoplasmosis in three Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) caused by genotype II of *Toxoplasma gondii*. J. Wildl. Dis. 48, 454–457.
- Khan, A., Taylor, S., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2009. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. PLoS Genet. 5, e1000404.
- Khan, I.A., Hakak, R., Eberle, K., Sayles, P., Weiss, L.M., Urban, J.F., 2008. Coinfection with *Heligmosomoides polygyrus* fails to establish CD8+ T-cell immunity against *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 76, 1305–1313.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33, 159–174.
- Langham, N.P.E., 1990. The diet of feral cats (*Felis catus* L.) on Hawke's Bay farmland, New Zealand. New Zealand Journal of Zoology 17, 243–255.
- Le Potier, M.F., Fournier, A., Houdayer, C., Hutet, E., Auvigne, V., Hery, D., Sanaa, M., Toma, B., 1998. Use of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. Vet. Rec. 143, 385–387.
- Legnani, S., Pantchev, N., Forlani, A., Zini, E., Schares, G., Balzer, J., Roccabianca, P., Ferri, F., Zanna, G., 2016. Emergence of cutaneous neosporosis in a dog receiving immunosuppressive therapy: molecular identification and management. Vet. Dermatol. 27, 49-e14.
- Liesenfeld, O., Dunay, I.R., Erb, K.J., 2004. Infection with *Toxoplasma gondii* reduces established and developing Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. Infect. Immun. 72, 3812–3822.
- Lilue, J., Müller, U.B., Steinfeldt, T., Howard, J.C., 2013. Reciprocal virulence and resistance polymorphism in the relationship between *Toxoplasma gondii* and the house mouse. Elife 2, e01298.
- Lippens, C., Estoup, A., Hima, M.K., Loiseau, A., Tatard, C., Dalecky, A., Bâ, K., Kane, M., Diallo, M., Sow, A., Niang, Y., Piry, S., Berthier, K., Leblois, R., Duplantier, J.-M.,

- Brouat, C., 2017. Genetic structure and invasion history of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: a legacy of colonial and contemporary times. *Heredity (Edinb)* 119, 64–75.
- Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M.S., Namasivayam, S., Swapna, L.S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B.P., Ajioka, J.W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J.C., Boyle, J.P., Dardé, M.L., Diaz-Miranda, M.A., Dubey, J.P., Fritz, H.M., Gennari, S.M., Gregory, B.D., Kim, K., Saeij, J.P.J., Su, C., White, M.W., Zhu, X.-Q., Howe, D.K., Rosenthal, B.M., Grigg, M.E., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J.C., Roos, D.S., Sibley, L.D., 2016. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun* 7, 10147.
- Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A.-L., Durand, P., Salle, B., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e876.
- Mercier, A., Garba, M., Bonnabau, H., Kane, M., Rossi, J.-P., Dardé, M.-L., Dobigny, G., 2013. Toxoplasmosis seroprevalence in urban rodents: a survey in Niamey, Niger. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 399–407.
- Miller, C.M.D., Smith, N.C., Ikin, R.J., Boulter, N.R., Dalton, J.P., Donnelly, S., 2009. Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-inducing helminth *Fasciola hepatica*. *PLoS ONE* 4, e5692.
- Molsher, R., Newsome, A., Dickman, C., 1999. Feeding ecology and population dynamics of the feral cat (*Felis catus*) in relation to the availability of prey in central-eastern New South Wales. *Wildlife Research* 26, 593–607.
- Murphy, R.G., Williams, R.H., Hughes, J.M., Hide, G., Ford, N.J., Oldbury, D.J., 2008. The urban house mouse (*Mus domesticus*) as a reservoir of infection for the human parasite *Toxoplasma gondii*: an unrecognised public health issue? *Int J Environ Health Res* 18, 177–185.
- Opsteegh, M., Langelaar, M., Sprong, H., den Hartog, L., De Craeye, S., Bokken, G., Ajzenberg, D., Kijlstra, A., van der Giessen, J., 2010. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 193–201.
- Opsteegh, M., Teunis, P., Züchner, L., Koets, A., Langelaar, M., van der Giessen, J., 2011. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *Int. J. Parasitol.* 41, 343–354.
- Owen, M.R., Trees, A.J., 1998. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology* 116 (Pt 4), 299–304.
- Pocock Michael J. O., Searle Jeremy B., White Piran C. L., 2004. Adaptations of animals to commensal habitats: population dynamics of house mice *Mus musculus domesticus* on farms. *Journal of Animal Ecology* 73, 878–888.

- Reperant, L.A., Hegglin, D., Tanner, I., Fischer, C., Deplazes, P., 2009. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. *Parasitology* 136, 329–337.
- Santiago, H.C., Oliveira, M.A., Bambilra, E.A., Faria, A.M., Afonso, L.C., Vieira, L.Q., Gazzinelli, R.T., 1999. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 67, 4939–4944.
- Schares, G., Koethe, M., Bangoura, B., Geuthner, A.-C., Randau, F., Ludewig, M., Maksimov, P., Sens, M., Bärwald, A., Conraths, F.J., Villena, I., Aubert, D., Opsteegh, M., Van der Giessen, J., 2018. *Toxoplasma gondii* infections in chickens – performance of various antibody detection techniques in serum and meat juice relative to bioassay and DNA detection methods. *International Journal for Parasitology*.
- Schares, G., Vrhovec, M.G., Pantchev, N., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., 2008. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. *Vet. Parasitol.* 152, 34–45.
- Shwab, E.K., Jiang, T., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2016. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 46, 141–146.
- Sikes, R.S., Gannon, W.L., 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92, 235–253.
- Singh, J., Graniello, C., Ni, Y., Payne, L., Sa, Q., Hester, J., Shelton, B.J., Suzuki, Y., 2010. *Toxoplasma* IgG and IgA, but not IgM, antibody titers increase in sera of immunocompetent mice in association with proliferation of tachyzoites in the brain during the chronic stage of infection. *Microbes Infect* 12, 1252–1257.
- Skinner, J.D., Smithers, R.H.N., 1990. *The Mammals of Southern African Subregion*. 2nd edn University of Pretoria: Pretoria.
- Slapeta, J.R., Koudela, B., Votýpka, J., Modrý, D., Horejs, R., Lukes, J., 2002. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *Vet. J.* 163, 147–154.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5844–5849.
- Thomasson, D., Wright, E.A., Hughes, J.M., Dodd, N.S., Cox, A.P., Boyce, K., Gerwash, O., Abushahma, M., Lun, Z.-R., Murphy, R.G., Rogan, M.T., Hide, G., 2011. Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. *Parasitology* 138, 1117–1123.
- Turner, D.C., Bateson, P., 2013. *The Domestic Cat: The Biology of its Behaviour*. Cambridge University Press.

- Uneke, C.J., Duhlińska, D.D., Ngwu, B. a. F., Njoku, M.O., 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Kwal, a rural district of Plateau-Nigeria. *Afr J Med Med Sci* 36, 109–113.
- Villena, I., Durand, B., Aubert, D., Blaga, R., Geers, R., Thomas, M., Perret, C., Alliot, A., Escotte-Binet, S., Thébault, A., Boireau, P., Halos, L., 2012. New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. *Vet. Parasitol.* 183, 203–208.
- Weinberg, G.A., Storch, G.A., 1985. Preparation of urine samples for use in commercial latex agglutination tests for bacterial antigens. *J. Clin. Microbiol.* 21, 899–901.
- Welter, A., Mineo, J.R., Silva, D.A. de O., Lourenço, E.V., Ferro, E.A.V., Roque-Barreira, M.C., da Silva, N.M., 2006. An opposite role is exerted by the acarian *Myocoptes musculus* in the outcome of *Toxoplasma gondii* infection according to the route of the protozoa inoculation. *Microbes Infect.* 8, 2618–2628.
- Wilson, D.E., 2009. *Handbook of the Mammals of the World: Lagomorphs and Rodents I.* Lynx.
- Yekkour, F., Aubert, D., Mercier, A., Murat, J.-B., Khames, M., Nguewa, P., Ait-Oudhia, K., Villena, I., Bouchene, Z., 2017. First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria. *Vet. Parasitol.* 239, 31–36.



Supplementary Fig. S1 . Flow chart indicating the number of small mammals collected in field sampling, submitted to PCR assays for detection of *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni* and *Hammondia hammondi* DNA, and with *T. gondii* DNA successfully genotyped with microsatellite markers.

Strain ID	Host species	Origin	MS Type	RFLP equivalent genotype	TUB2	W35	TgM-A	B18	B17	M33	MIV.1	MX1.1	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83	Latitude	Longitude	References
GT1 (HG1*)	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	USA	I	ToxoDB#10	291	248	209	160	342	169	274	358	209	168	145	119	265	087	306			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
ME49 (HG2)	Sheep <i>Ovis aries</i>	USA	II	ToxoDB#1	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	091	310			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
VEG (HG3)	Human (AIDS)	USA	III	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	188	153	111	267	089	312			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
MAS (HG4)	Human (congenital)	France	Atypical	ToxoDB#17	291	242	205	162	362	169	272	358	221	166	142	111	332	095	338			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
GUY-RUB (HG5)	Human adult	French Guiana	Atypical	ToxoDB#98	289	242	205	170	360	167	274	356	223	190	142	109	259	085	312			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
FOU (HG6)	Human (transplant)	France (African patient)	<i>Africa 1</i>	ToxoDB#6	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	281	089	306			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
CAST (HG7)	Human (AIDS)	USA	Atypical	ToxoDB#28	291	242	205	158	342	167	276	356	211	168	147	119	279	087	306			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
TgCatBr05 (HG8)	Cat <i>Felis silvestris catus</i>	Brazil	Atypical	ToxoDB#42	291	242	205	160	362	165	278	356	237	174	140	111	265	089	314			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
P89 (HG9)	Pig <i>Sus scrofa domestica</i>	USA	Atypical	ToxoDB#8	291	242	205	160	348	165	278	356	213	190	142	111	261	087	314			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
GUY-VAND (HG10)	Human adult	French Guiana	Atypical	ToxoDB#60	291	242	203	162	344	167	276	356	217	170	142	113	277	091	308			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
Cougar (HG11)	Cougar <i>Puma concolor</i>	Canada	Atypical	ToxoDB#66	289	242	205	158	336	169	274	354	219	174	151	119	259	079	332			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
ARI (HG12)	Human (transplant)	USA	Atypical	ToxoDB#5	289	242	209	158	336	169	274	362	215	170	147	131	295	089	316			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
TgCiPRC04 (HG13)	Cat <i>Felis silvestris catus</i>	China	<i>Chinese 1</i>	ToxoDB#9	293	242	211	160	336	169	274	354	215	172	145	123	281	093	308			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
TgCkGh01 (HG13)	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Ghana	Atypical	ToxoDB#137	293	242	203	156	336	165	NA	NA	215	176	130	109	281	NA	306			Su et al., 2012
TgA105004 (HG14)	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	<i>Africa 3</i>	ToxoDB#203	291	242	207	160	342	165	278	354	223	166	142	111	277	097	310			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
TgCiCo05 (HG15)	Cat <i>Felis silvestris catus</i>	Columbia	Atypical	ToxoDB#61	291	242	205	160	336	165	276	356	223	166	142	121	279	087	304			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
CASTELLS (HG16)	Sheep <i>Ovis aries</i>	Uruguay	Atypical	ToxoDB#15	287	242	207	158	358	169	274	356	239	164	138	109	283	087	324			Lorenzi et al., 2016
TgSpEt23	Sheep <i>Ovis aries</i>	Ethiopia	III	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	111	271	089	312			Gebremedhin et al., 2014
TgGtEt05	Goat <i>Capra aegagrus</i>	Ethiopia	III	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	113	267	089	312			Gebremedhin et al., 2014

<i>hircus</i>																					
TgSpEt18	Sheep <i>Ovis aries</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	211	176	140	109	267	091	308	Gebremedhin et al., 2014	
TgSpEt25	Sheep <i>Ovis aries</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	211	176	140	121	267	091	308	Gebremedhin et al., 2014	
TgGtEt08	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	211	178	142	109	285	085	310	Gebremedhin et al., 2014	
TgSpEt06	Sheep <i>Ovis aries</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	213	176	140	115	265	117	308	Gebremedhin et al., 2014	
TgSpEt08	Sheep <i>Ovis aries</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	213	178	140	115	265	089	308	Gebremedhin et al., 2014	
TgGtEt19	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	215	176	138	117	267	099	312	Gebremedhin et al., 2014	
TgGtEt01	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	225	172	142	117	259	093	308	Gebremedhin et al., 2014	
TgGtEt14	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	233	176	140	113	269	097	312	Gebremedhin et al., 2014	
TgGtEt02	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	235	176	138	115	279	099	312	Gebremedhin et al., 2014	
TgGtEt04	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	237	176	140	113	273	093	312	Gebremedhin et al., 2014	
TgSpEt26	Sheep <i>Ovis aries</i>	Ethiopia	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	239	176	138	115	281	097	310	Gebremedhin et al., 2014	
GAB1-GAL-DOM06	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	III	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	211	190	147	111	267	085	312	Mercier et al., 2010	
GAB1-GAL-DOM11	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	III	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	145	111	273	089	312	Mercier et al., 2010	
GAB1-CAP-AEG06	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	Gabon	III	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	149	111	267	089	312	Mercier et al., 2010	
GAB2-GAL-DOM06	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	Atypical	unknown	289	242	207	160	336	165	278	356	223	190	147	111	261	103	316	Mercier et al., 2010	
GAB4-GAL-DOM01	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	Atypical	unknown	291	242	205	160	336	165	278	356	213	190	145	111	269	089	306	Mercier et al., 2010	
GAB3-GAL-DOM02	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	Africa 1	ToxoDB#6	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	269	089	306	Mercier et al., 2010	

GAB3-GAL-DOM11	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	<i>Africa 1</i>	ToxoDB#6	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	273	087	304			Mercier et al., 2010
GAB5-GAL-DOM01	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Gabon	<i>Africa 1</i>	ToxoDB#6	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	149	111	277	087	306			Mercier et al., 2010
DZ-Cat02	Cat <i>Felis silvestris catus</i>	Algeria	II	ToxoDB#1 or 3	NA	242	207	158	336	169	274	356	211	178	140	109	279	109	310			Yekkour et al., 2017
DZ-Cat44	Cat <i>Felis silvestris catus</i>	Algeria	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	NA	219	174	140	111	277	105	308			Yekkour et al., 2017
DZ-Cat52	Cat <i>Felis silvestris catus</i>	Algeria	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	NA	158	336	169	274	356	219	174	140	111	287	095	308			Yekkour et al., 2017
DZ-Cat86	Cat <i>Felis silvestris catus</i>	Algeria	II	ToxoDB#1 or 3	289	242	207	158	336	169	274	356	219	174	140	113	259	105	312			Yekkour et al., 2017
TgCgamb01	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	Dakar, Senegal	II (11/15)	ToxoDB#1 (or 3)	NA	242	207	158	NA	169	274	NA	223	174	140	117	NA	101	308	14.748922	-17.515779	this study
TgMmus01	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Dakar, Senegal	II (15/15)	ToxoDB#1 (or 3)	289	242	207	158	336	169	274	356	235	174	140	123	267	099	308	14.723165	-17.434107	this study
TgCgamb02	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	Dakar, Senegal	<i>Africa 1</i> (15/15)	ToxoDB#6	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	145	111	269	085	306	14.723165	-17.434107	this study
TgMmus02	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Dakar, Senegal	II (15/15)	ToxoDB#1 (or 3)	289	242	207	158	336	169	274	356	235	174	140	129	267	099	308	14.672805	-17.441768	this study
TgMmus03	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Dakar, Senegal	II (15/15)	ToxoDB#1 (or 3)	289	242	207	158	336	169	274	356	233	174	140	115	281	093	312	14.673357	-17.436918	this study
TgColiv01	Shrew <i>Crocidura olivieri</i>	Dakar, Senegal	<i>Africa 1</i> (15/15)	ToxoDB#6	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	273	089	306	14.704883	-17.454859	this study
TgCgamb03	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	Joal-Fadiouth, Senegal	Atypical (15/15)	unknown	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	299	099	310	14.156758	-16.836988	this study
TgCgamb04	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	Rufisque, Senegal	II (15/15)	ToxoDB#1 (or 3)	289	242	207	158	336	169	274	356	215	184	140	109	281	103	310	14.714496	-17.277045	this study
TgCgamb05	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	Rufisque, Senegal	III-like (15/15)	unknown	291	248	205	160	336	165	278	356	209	190	145	111	267	089	312	14.717185	-17.268817	this study

TgMmus04	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Dakar, Senegal	III (15/15)	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	113	267	91	312	14.680809	-17.458683	this study
TgMmus05	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Dakar, Senegal	III (15/15)	ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	113	267	91	312	14.680378	-17.458495	this study
TgMmus06	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Dakar (Goree Island), Senegal	II (15/15)	ToxoDB#1 (or 3)	289	242	207	158	336	169	274	356	237	176	140	113	279	95	310	14.668615	-17.400355	this study
TgColiv02	Shrew <i>Crocidura olivieri</i>	Dakar, Senegal	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14.724774	-17.428913	this study
TgMmus07	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Joal-Fadiouth, Senegal	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14.153158	-16.822918	this study
TgMmus08	House mouse <i>Mus musculus domesticus</i>	Rufisque, Senegal	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14.710596	-17.269131	this study
TgCgamb06	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	Dakar, Senegal	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14.723555	-17.429603	this study

*The respective haplogroups (HG) of belonging of reference strains according to Su et al., 2012 or Lorenzi et al., 2016 is indicated when available.

Supplementary Table S1 . Genotyping results obtained by the analysis of 15 microsatellite markers for the 16 strains from this study (in bold letters), for 25 strains previously collected in Africa and for 17 reference strains representing the *T. gondii* global diversity (including 3 strains from Africa).

Note : A la suite de la soumission de cet article, les échantillons de 198 individus supplémentaires issus de la ville de Dakar nous ont été envoyés par nos collaborateurs du CBGP et ont été soumis au même protocole. Les analyses ont donc été réitérées en incluant ces nouveaux individus.

III.2.2. Principaux résultats

Au total, 828 petits mammifères capturés au Sénégal ont été inclus dans cette étude.

- La concordance entre les résultats de la sérologie par MAT ceux de la qPCR était très variable en fonction de l'espèce de petit mammifère considérée. Chez la souris domestique *Mus musculus domesticus*, sur 671 individus testés, le MAT a montré une très mauvaise concordance avec les résultats de la qPCR. Sur de plus petits effectifs (<80), la concordance entre le MAT et la qPCR semblait également très mauvaise pour le rat noir *Rattus rattus*, modéré pour *Crocidura olivieri* et bonne pour *Cricetomys gambianus*. Pour ces trois espèces, ces résultats demandent confirmation sur des effectifs plus importants. Pour la souris domestique *M. mus. domesticus*, ces résultats nous amènent à la conclusion que la sérologie par MAT n'est pas un test fiable pour la détection de l'infection par *T. gondii* chez les populations naturelles de cette espèce.
- Les calculs de prévalence par espèce, au vu de la fiabilité mitigée de la sérologie par MAT qui ressort des résultats de la première partie de notre travail, se sont basés sur les résultats de la qPCR pour la détermination du statut infectieux des individus inclus dans cette étude. Nous avons relevé une différence significative dans les niveaux de prévalence entre les espèces. La prévalence était de 27,7% chez *C. gambianus*, 15,6% chez *C. olivieri*, 13,3% chez *M. mus. domesticus* et 3,8% chez *R. rattus*. Ces différences semblent en lien avec la probabilité d'exposition des individus de chaque espèce aux oocystes de *T. gondii* dans l'environnement en fonction de l'espérance de vie, la superficie moyenne du domaine vital et la fréquence de contact avec le sol. Ces résultats vont dans le sens d'une source environnementale de l'infection pour ces espèces et constituent une nouvelle contribution au débat et à la controverse concernant le mode d'infection des rongeurs en condition naturelle. En effet, plusieurs études sont arrivées à des conclusions comparables en montrant l'existence d'une association entre le niveau de prévalence et la probabilité d'exposition aux oocystes de *T. gondii* propre à chaque espèce en fonction de ses traits biologiques et de son mode de vie. En revanche, d'autres relèvent des niveaux de prévalence élevés chez plusieurs espèces de rongeurs, indépendamment du risque d'exposition à *T. gondii* dans leurs environnements respectifs. Plus précisément, des prévalences particulièrement élevées et plutôt inhabituelles pour des rongeurs ont été rapportées dans des secteurs où les chats sont très rares voire absents et s'expliquent, selon les auteurs, par une perpétuation du cycle de transmission entre rongeurs par transmission verticale du parasite d'une génération à l'autre. Cette question épidémiologique mérite d'être approfondie et une standardisation des techniques de détection pourrait diminuer les discordances importantes entre les résultats (et donc les conclusions) apportés par les différentes études.
- Nous avons pu génotyper la souche infectante chez uniquement 12 parmi les 110 petits mammifères infectés capturés au Sénégal. Ces souches appartenaient aux lignées

transcontinentales *type II* (n=6) et *type III* (n=2) et à la lignée africaine *Africa 1* (n=2). De même, deux souches africaines atypiques différentes ont également été caractérisées. Ce nombre limité de souches génotypées n'a pas permis une comparaison robuste de la diversité génétique entre espèces. A Dakar, où le nombre de souches génotypées était le plus élevé (n=9), nous avons néanmoins relevé que deux des trois souches génotypées chez des individus d'espèces africaines autochtones (*C. gambianus* et *C. olivieri*) étaient de la lignée *Africa 1*, connue pour être létale pour la souris de laboratoire. Cela suggère que ces espèces sont résistantes à l'infection par des souches de cette lignée, contrairement à la souris de laboratoire. A l'opposé, les six souches identifiées chez les souris invasives *M. mus. domesticus* capturées dans quatre quartiers de Dakar appartenaient aux lignées clonales *type II* et *type III*, connues pour être avirulentes pour la souris de laboratoire. L'absence de souches de la lignée *Africa 1* chez les souris suggère, à l'instar de la souris de laboratoire, que les populations naturelles de cette espèce pourraient également être susceptibles à l'infection par les souches de cette lignée. Cependant, le nombre trop faible de souches sur lequel se base cette hypothèse ne permet pas d'apporter une conclusion solide à cette question. La confirmation d'une susceptibilité naturelle des souris domestiques *M. mus. domesticus* à l'infection par la lignée *Africa 1* ou par d'autres lignées virulentes pour la souris de laboratoire pourrait être un élément clé dans la compréhension des facteurs qui contribuent à façonner la structure des populations de *T. gondii* à travers le monde. Plus précisément, cela expliquerait pourquoi ces lignées virulentes sont rares dans les régions où la souris domestique *M. mus. domesticus* est le rongeur commensal prédominant.

Chapitre IV. Rôle des rongeurs commensaux dans l'évolution de la structure des populations de *Toxoplasma gondii* chez la faune domestique du Sénégal

IV.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons tenté de comparer la diversité génétique des souches de *T. gondii* entre espèces de petits mammifères autochtones d'Afrique et espèces invasives, au niveau de trois régions côtières du Sénégal. Ces espèces, qui partagent le même habitat, seraient *a priori* exposées aux mêmes souches du parasite. Sur un petit nombre de souches génotypées, nous avons dénoté des différences dans leur diversité entre espèces africaines autochtones de petits mammifères et espèces invasives. Ces résultats suggèrent des adaptations distinctes des hôtes de *T. gondii* aux différentes souches du parasite. Cependant, le faible nombre de souches génotypées, malgré un effectif important de petits mammifères capturés, a constitué un obstacle majeur à la formulation de conclusions solides sur cette question. En effet, les niveaux de prévalence de l'infection par *T. gondii* sont généralement faibles chez ce type d'hôtes et les charges tissulaires de parasites sont souvent très réduites, ce qui limite le succès du génotypage de la souche infectante dans beaucoup de cas. Dans l'objectif de contourner cette limitation, et afin de pouvoir obtenir un nombre de souches plus important, une approche méthodologique différente a été employée dans l'étude présentée dans ce chapitre. Nous avons isolé des souches, principalement à partir de volailles domestiques, au Sénégal, dans les régions portuaires de Dakar et de Saint-Louis d'une part, et à l'intérieur des terres dans la région de Kédougou d'autre part. Les volailles domestiques, et en particulier les poules, sont reconnues comme étant de bons bio-indicateurs des souches qui circulent à une échelle locale (Dubey et al., 2015). En effet, ces animaux ont une aire de circulation réduite par rapport à d'autres animaux domestiques, et ils partagent souvent leur environnement avec les chats. Leur comportement alimentaire, caractérisé par un grattage fréquent du sol pour la recherche de nourriture, semble augmenter leur exposition aux déjections de chats potentiellement contaminées par des oocystes et enfouies dans le sol (Dubey et al., 2015). Les rongeurs constituant la proie principale du chat (Langham, 1990; Molsher et al., 1999; Turner and Bateson, 2013), il est probable que les souches qui infectent les volailles reflètent celles qui circulent chez les espèces de rongeurs locales les plus abondantes. Au Sénégal, la répartition des rongeurs commensaux montre un fort contraste géographique (Dalecky et al., 2015). A Dakar et à Saint-Louis, la souris invasive *M. mus. domesticus* est de loin le rongeur commensal le plus commun dans ces deux régions. A contrario, c'est le rongeur africain *Mastomys natalensis* qui est prédominant dans la région de Kédougou. Il est donc raisonnable de supposer que les souches isolées chez les volailles à Dakar et à Saint-Louis reflètent principalement celles qui circulent chez la souris *M. mus. domesticus* et que les souches isolées chez les volailles à Kédougou reflètent principalement celles qui circulent chez *Mastomys natalensis*. Les souches de *T. gondii* isolées dans ces trois régions ont été génotypées par l'analyse de 15 marqueurs microsatellites. Des analyses de génétique de populations ont été réalisées sur les données génétiques obtenues afin d'identifier les lignées clonales de *T. gondii* qui circulent dans ces régions et de caractériser leur distribution. La virulence de ces souches a été évaluée sur modèle murin. Enfin, pour tenter de retracer les voies de migration des populations de *T. gondii* du Sénégal, les souches sénégalaises ont été comparées, d'une part, à des souches d'Europe de l'Ouest (France et

Portugal) pour tester l'hypothèse d'une voie de migration maritime et, d'autre part, à des souches d'Afrique (Egypte, Ethiopie et Afrique du Sud) pour tester celle d'une voie de migration terrestre.

Cette étude a donné lieu à l'article suivant :

Article 3 : **Galal L**, Sarr A, Cuny T, Brouat C, Sembène M, Diagne M, Diallo M, Sow A, Hamidović A, Plaut N, Dardé ML, Ajzenberg D, and Mercier A. Role of human activities and host-mediated selection of strains in shaping *Toxoplasma gondii* population structure: the example of Senegal.

En soumission dans *PLOS Neglected Tropical Diseases*.

Role of human activities and host-mediated selection of strains in shaping *Toxoplasma gondii* population structure: the example of Senegal

Lokman Galal ^{a,*}, Amedine Sarr ^a, Thomas Cuny ^a, Carine Brouat ^b, Fatoumata Coulibaly ^{c,d}, Mbacké Sembène ^e, Moustapha Diagne ^e, Mamoudou Diallo ^f, Aliou Sow ^f, Azra Hamidović ^a, Nicolas Plault ^a, Marie-Laure Dardé ^{a,g}, Daniel Ajzenberg ^a, and Aurélien Mercier ^{a,g}

^a INSERM UMR_S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges 87025, France

^b CBGP, IRD, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Univ. Montpellier, 755 avenue du campus Agropolis, 34988 Montferrier-sur-Lez, Cedex, France

^c Laboratory of Parasitology-Mycology, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Cheikh Anta Diop, Fan 7600, BP 5100, Dakar, Senegal

^d Université Péléforo Gon Coulibaly, Korhogo, Côte d'Ivoire.

^e Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop (UCAD), BP 5005 Fann, Dakar, Senegal.

^f BIOPASS, CBGP-IRD, ISRA, UCAD, Campus de Bel-Air, BP 1386, Dakar, CP 18524, Senegal

^g Centre National de Référence Toxoplasmose/*Toxoplasma* Biological Resource Center, CHU Limoges, 87042 Limoges, France

*Corresponding author

Lokman Galal

INSERM UMR_S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges 87025, France

Tel: +33 (0) 5 19 56 42 64

Fax: +33 (0) 5 55 43 58 21

E-mail: lokmanmagalal@gmail.com

Summary

Toxoplasma gondii is a worldwide zoonotic protozoan but parasite populations as well as clinical expression of human toxoplasmosis exhibit contrasting patterns across geographic regions. The determinants of this geographical structure are poorly understood.

Here we describe a population genetic study of 77 *T. gondii* animal isolates from Senegal to investigate the possible role of human activities in shaping the current population structure of this ubiquitous parasite. Isolates were obtained in two port cities of Senegal founded by French colons (Dakar and Saint-Louis) and in one inland region (Kedougou). Population genetic analyses using 15 microsatellite markers revealed different patterns between the port cities where lineages non-virulent for laboratory mice (type II, type III, and Africa 4) were the most abundant, and Kedougou where the mouse-virulent Africa 1 lineage was common. Given the predominance of *Mus musculus domesticus* in Dakar and Saint-Louis and the

experimental virulence of the *T. gondii* Africa 1 lineage for this species, our findings support that this invasive rodent (introduced in Senegal since colonial times) probably counter-selects the Africa 1 lineage in these two ports cities. At the opposite, the native African rodent *Mastomys natalensis*, which is predominant in Kedougou, may act as a competent reservoir for the Africa 1 lineage in this region. The comparison of the microsatellite alleles of type II strains from Senegal to type II strains from other areas in Africa and Western Europe, using discriminant analysis of principal components and Network analysis, supported a Western European origin of the type II lineage in Senegal.

Collectively, these findings support that human activities could drive profound changes in the genetic diversity of *T. gondii* populations in a given area. The adaptation of invasive hosts to only certain *T. gondii* strains will probably determine the persistence of these strains in the environment, which will be available for human infection.

Introduction

Toxoplasma gondii is a zoonotic protozoan with a worldwide distribution. Felids are the only final hosts and intermediate hosts include all other species of mammals and birds. Infection can occur through the ingestion of few of the million oocysts shed in the environment by cats during the 3 to 14 days following their primary infection [1]. Infected hosts often develop persistent cysts in their tissue, which constitute the main source of infection for cats and an important potential source of infection for meat-consuming intermediate hosts, including humans. The genetic diversity of *T. gondii* strains shows a strong geographical structure [2–4]. This geographical pattern is of epidemiological importance because *T. gondii* genotype has often been associated with disease severity in immunocompetent individuals, especially in South America [5–10]. Few data are available for Africa, but some of them indirectly suggest a significant burden of ocular toxoplasmosis in West and Central Africa [11,12]. Evidence of an important role of human-mediated dispersal in shaping *T. gondii* population structure is supported by the transcontinental occurrence of some lineages. Mainly, the remarkable success of the archetypal type II and type III lineages in global spread has been attributed to human exchanges through movements of infected livestock and involuntary dispersal of infected rodents via maritime or terrestrial routes [13,14]. The intensification of maritime trade since the sixteenth century has probably given type II and type III lineages the opportunity to spread from Western Europe to new lands such as America and Australia, but also to West and Central Africa. [13,4,15]. Based on these assumptions, Lehmann et al. [13] speculated that the genetic background of *T. gondii* strains near ports that were active during early transatlantic trade should differ markedly from that in regions distant from such ports.

The aim of the present study was to test this hypothesis in Senegal (West Africa). Unlike North and East Africa where the transcontinental lineage type II, followed by type III, are by far the predominant lineages, West and central Africa seem to be the refuge for a more autochthonous diversity of African *T. gondii* strains, mainly composed of strains of the Africa 1 lineage [4]. This pattern has been attributed to the more recent exposure of West and central Africa to the influence of globalization compared to North and East Africa that have anciently been linked to Europe and Asia through privileged trade exchanges during the successive historical periods. West Africa appears therefore to be a suitable framework to test the influence of relatively recent human exchanges on *T. gondii* population structure. In this study, we compared the diversity of *T. gondii* strains circulating among domestic animals in the port cities of Saint-Louis and Dakar, which were founded during the colonial period by French sailors, with those circulating in the Kedougou region inland, which is located more

than 500 kilometres from the coast. In order to evaluate the extent of gene flow between *T. gondii* populations from Senegal and other regions of the world through both terrestrial and maritime routes, we compared type II *T. gondii* strains from Senegal to those from other areas in Western Europe and Africa.

Materials and Methods

Study area and *T. gondii* strains isolation

Between April 2016 and April 2018, three regions of Senegal were investigated for *T. gondii* strain isolation: the coastal regions of Dakar and Saint-Louis and the inland region of Kedougou. In each of these regions, sampling was conducted in both urban and rural localities. Our sampling efforts focused mainly on backyard poultry raised around households and were occasionally completed by opportunist sampling of other domestic or wild animals when they were available. The geographic origin of each animal included in this study was checked by questioning the owners to insure that infection had occurred locally. All sampled households were georeferenced using a Juno SC GPS Data Collection PDA (Trimble, California, USA). Blood samples were collected from poultry from the wing vein for serological screening. For animals sampled opportunistically, as in the case of home slaughter or for animals found freshly dead by the roadside, blood samples were collected during slaughtering or from the clot in the heart during post-mortem examination. After separation by centrifugation, sera were tested for presence of antibodies against *T. gondii* using the modified agglutination test (MAT) [16]. Overall, 2,034 animals were sampled, the majority being chickens (79.6%) and ducks (15.1%) (Table S1). According to poultry's availability, a total of 122 seropositive domestic birds were purchased, brought alive to the Institut de Recherche pour le Développement (Belair, Dakar) and euthanized. Brain and heart samples were collected and kept at 4°C before being processed for parasite isolation. In addition, brain and/or heart samples of 33 others seropositive animals were also kept at 4°C before processing.

The isolation protocol was performed as reported previously [17]. Brain and heart samples of each animal were homogenized together using a blender in saline solution (0.9% NaCl) containing 0.4% of trypsin and 40µg/ml gentamycin and incubated in a shaker water bath at 37°C for 90 min. The suspensions were filtered through two layers of gauze and washed three times by centrifugation for 10 min at 2600 rpm. The obtained digestates were then re-suspended in saline solution and treated with an antibiotic saline solution (1000 U/ml penicillin and 100 µg streptomycin/ml in saline solution). The digestates were intraperitoneally inoculated into 3 out-bred female Swiss Webster mice (1 mL/mice) provided by the Institut Pasteur of Dakar. All inoculated mice were monitored daily for clinical signs of toxoplasmosis during 4 weeks. Ill mice developing ascites were punctured for peritoneal exudates to check for the presence of tachyzoites before being euthanized. After 4 weeks, asymptomatic mice were tested for *T. gondii* antibodies by MAT serology (cut-off at 1:20 serum dilution). Seropositive mice were euthanized and brain samples were homogenized with 1 ml of physiological solution for microscopic examination of tissue cysts. For each sample, 200 µl of peritoneal exudate or brain homogenate was stored at -20°C for DNA extraction. Live parasites were cryopreserved in liquid nitrogen with RPMI containing 10% FCS and 10% DMSO and were sent to the *T. gondii* Biological Resource Centre (BRC), Limoges, France, (<http://www.toxocrb.com>) for genotyping analysis and strain preservation.

All experimental procedures were conducted according to European guidelines for animal care ("Journal Officiel des Communautés Européennes", L358, December 18, 1986).

The isolation protocol was accepted by the Research Ethics Committee of Cheikh Anta Diop University (Registration numbers: 0232/2017/CAR/UCAD and 0278/2018/CAR/UCAD).

DNA extraction and Microsatellite genotyping

Total genomic DNA was extracted from 200µl of mice brain homogenates or ascites using the QIAamp DNA MiniKit (Qiagen, Courtaboeuf, France). For animal samples that did not infect mice, DNA extraction was performed directly on 200µl of animal tissue digestate. *Toxoplasma gondii* strains were genotyped using 15 microsatellite markers distributed on 11 of the 14 chromosomes composing *T. gondii* genome in a single multiplex PCR-assay, as described previously [18]. Those 15 loci included a combination of 8 “typing” markers with low polymorphism (*TUB2*, *W35*, *TgM-A*, *B17*, *B18*, *M33*, *IV.1* and *XI.1*) that show little or no variation within lineages and 7 “fingerprinting” markers with high polymorphism (*M48*, *M102*, *N83*, *N82*, *AA*, *N61*, *N60*) that show significant variation within lineages [19]. For each strain successfully genotyped at some loci but not at others, each failed locus was amplified separately by simplex PCR (to prevent primer competition). PCR products were sized using capillary electrophoresis on ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the GenScan 500 ROX dye size standard (Applied Biosystems). Results were analyzed using GeneMapper 5.0 software packages (Applied Biosystems).

Assignment of Senegalese *T. gondii* strain to clonal lineages

To assign each strain to a clonal lineage, Senegalese multilocus genotypes (MLGs) were compared to those from reference strains representative of the main *T. gondii* clonal lineages previously described worldwide. Those reference strains are SNP-inferred lineages from previous studies, either based on multilocus sequence typing (MLST), whole genome sequencing (WGS), or multilocus RFLP analysis (Table S2). Assignment to a clonal lineage relied on the examination of the allelic combination at 8 “typing” alleles that constitutes the lineage identity for each strain [18]. In order to further confirm the relationships of Senegalese MLGs with the known *T. gondii* lineages, a UPGMA dendrogram was generated by including all MLGs from Senegal with a single reference MLG for each of the major clonal lineages that were identified worldwide (Table S2). This UPGMA dendrogram was produced using the BRUVO.BOOT function (based on Bruvo’s genetic distance) with 1,000 bootstrap replications, implemented in the “Poppr” package [20] in R version 3.4.0. This package is specifically designed for analysis of populations that are clonal, sexual or admixed, and that may not fit to basic assumptions of the Wright–Fisher model of populations, which imply panmixia and Hardy–Weinberg equilibrium. Diversity indices (Simpson index; Evenness) within each lineage identified by UPGMA were calculated using the “diversity_ci” function of the “Poppr” package which corrects diversity indices for sample size using rarefaction. This function was also ran for linkage disequilibrium (LD) estimations by the calculation of the index of association (*I_a*) and the standardized index of association (*r_d*) with 1,000 permutations, the latter removing the dependency of *I_a* on the number of loci.

Analysis of gene flow pattern between *T. gondii* strains from Senegal and other regions of the world

Minimum spanning networks (MSN) based on Bruvo’s genetic distance were drawn using “Poppr” to visualize the relationships between *T. gondii* strains from Senegal and those from areas of Western Europe (France and Portugal) and Africa (Egypt, Ethiopia and South Africa) for each lineage (refer to Table S3 for genotyping data of the collection of strains used for comparative analysis). Discriminant analysis of principal components

(DAPC) was used to identify genetic populations within lineage using a nonparametric approach (free from Hardy–Weinberg assumptions). In this model, genetic data are initially transformed using a principal components analysis (PCA) and subsequently clusters are identified using discriminant analysis (DA). DAPC was performed using the adegenet package [21] implemented in R version 3.4.0.

Evaluation of strain virulence

A *T. gondii* strain was defined as virulent if it caused mortality in all infected mice within 4 weeks of bioassay or if all infected mice developed an acute toxoplasmosis (immobility, rapid breathing, and *ruffled* fur) within the same period. The etiologic role of *T. gondii* in mortality or acute disease was confirmed by the observation of tachyzoites in peritoneal exudates punctured before euthanasia or death or in peritoneal lavage made postmortem. The human endpoint of acute disease at which mice were euthanized was defined as a state of fever and prostration for more than three consecutive days. If at least one mouse survived the infection at the end of the four weeks of monitoring, the infecting *T. gondii* strain was considered non-virulent. The occurrence of a region-effect in mouse virulence was tested by Fisher's exact test, adopting a 95% confidence interval.

Results

Sampling followed by mouse bioassay yielded a total of 72 *T. gondii* isolates from the three studied regions of Senegal in infected mice, either in brain tissue cysts or in tachyzoites from peritoneal exudates. Microsatellite analysis of isolates revealed no mixed infection as each single isolate contained only one *T. gondii* strain. Five additional isolates could be directly genotyped in DNA samples extracted from tissue digestate when mouse bioassay was unsuccessful. Four strains isolated in mice and one DNA sample were not successfully genotyped at all the 15 microsatellite markers (from 0 to 8 markers were amplified). Of the 72 fully genotyped strains, 32 were originating from the region of Saint-Louis, 23 were from the region of Dakar, 16 were from the region of Kedougou, and one was from an undetermined origin. The large majority of strains (70/72) had MLGs that were similar or identical to those of four reference strains based on the allelic combination of the 8 microsatellite "typing" markers that is characteristic of each lineage: ME49 (type II lineage), VEG (type III lineage), FOU (Africa 1 lineage), and TgEgCat65 (multilocus RFLP lineage ToxoDB#20). For the first time, this latter lineage is described using microsatellite markers and we designated it as "Africa 4 lineage". Within the type II cluster, 4 of the 26 MLGs composing this cluster were single-repeat variants (allele 244 instead of 242 at the *W35* locus) of the ME49 type II lineage reference strain. All these 4 single-repeat variants of type II were confined to the city of Saint-Louis. All Type III and Africa 1 MLGs from the Senegalese population strictly matched the 8 "typing" alleles of the reference VEG type III and FOU Africa 1 strains, respectively. Within the Africa 4 cluster, all but one MLG (a single-repeat variant of the TgEgCat65 Africa 4 reference strain with allele 293 instead of 291 at the *TUB2* marker) shared the same alleles for the 8 "typing" markers. Two MLGs (160510Gdom02 and 160517Cmos22) were composed of different admixtures of alleles compatible with a recombination between type III and Africa 1 strains at the 15 analyzed loci. Only fully genotyped strains (n=72) were considered in all subsequent genetic analysis. The MLG function of the "Poppr" package identified 59 MLGS among the 72 fully genotyped Senegalese strains and these 59 MLGS were clustered into four major groups supported by bootstrap values ≥ 60 with the UPGMA dendrogram. These four clusters were largely congruent with the four groups inferred from the allelic combinations of the 8 "typing" loci (Fig

1). In the UPGMA dendrogram, the two recombinant MLGs identified from the previous analysis were closer to MLGs from the type III group than those from any other group and were therefore designated as type III-*like* strains. Sexual recombination within a population notoriously weakens bootstrap support of parental groups. Consistently, re-generating the UPGMA dendrogram after removal of these 2 MLGs markedly strengthened the bootstrap support of the Type III and Africa 1 clusters (data not shown). The four lineages were separated by large genetic distances and reproduction appeared to be largely clonal, therefore the four lineages were considered separately in all subsequent analyses.

Within-lineage genetic diversity

The values of Simpson's diversity index (λ) using a rarefaction procedure ($n=7$) ranged from 0.79 to 0.86 according to the clustering inferred from UPGMA dendrogram (Table 1). Their evenness values ($E.5$) ranged from 0.91 to 1. Linkage disequilibrium (LD) tests revealed a strong clonal pattern by both I_a (index of association) and r_d (standardized index of association) tests in all the 4 clusters inferred from UPGMA dendrogram (Table 1).

Spatial structure of Senegalese *T. gondii* populations

The Africa 1 lineage was the predominant lineage in the inland region of Kedougou (Fig 2). Only *T. gondii* strains belonging to the Africa 1 lineage were found in the rural localities surrounding the city of Kedougou. Type II and Africa 4 lineages were sporadically isolated in this region and were restricted to the city of Kedougou. At the opposite, type II, followed by type III and Africa 4 were the three main lineages found in both urban and rural localities of the coastal region of Dakar. Only one strain of Africa 1 lineage could be isolated in a rural locality within this region. In the coastal region of Saint-Louis, type II was also the predominant lineage in urban localities and the only lineage that could be identified in the rural localities of this region. Africa 4 was repeatedly isolated in the city of Saint-Louis, whereas type III and Africa 1 were only isolated once, respectively.

Fig 2. Geographical distribution of Senegalese *Toxoplasma gondii* clonal lineages and strains. (A) Map of the distribution of *Toxoplasma gondii* clonal lineages and strains in Senegal. Black dots indicate regions from where *T. gondii* isolates fully genotyped were collected. (B,C and D) Satellite maps of Saint-Louis, Dakar and Kedougou regions, respectively. (A,B,C and D) Sizes of pie charts correlate with the total number of isolates (n) and colors indicate different clonal lineages of *T. gondii* strains.

Analysis of gene flow pattern between Senegal and other regions of the world

The paucity of strains belonging to the type III, Africa 1 and Africa 4 lineages precluded the need for extensive analysis of these lineages and hence our analyses focused on strains of type II lineage. Within the Minimum spanning networks (MSN) representing strains of type II lineage (Fig 3), Senegalese strains segregated from strains from African countries in most branches of the network and exhibited strong intermingling pattern with strains from Western Europe (France and Portugal).

Using model selection based on Bayesian information criterion (BIC) values, the optimal number of clusters was $K=5$ among type II strains from Senegal, France, Portugal, Ethiopia, Egypt, and South Africa (Fig 4). Those five clusters were differentially distributed between geographical populations. DAPC 4 was confined to South Africa. All other DAPC clusters exhibited extensive geographical distribution in Western Europe and Africa although DAPC 2

was the predominant population in Ethiopia, DAPC 3 in Egypt, and DAPC 1 and 5 in Senegal, France and Portugal.

Virulence of *T. gondii* in mice

The virulence of *T. gondii* isolates in bioassayed mice varied significantly between Dakar and Saint-Louis on one hand and Kedougou on the other hand (Fig 5). Virulent isolates were more prevalent in Kedougou region compared to Saint-Louis and Dakar where non-virulent isolates were predominant. Lineage assignment with the eight “typing” microsatellite markers was highly predictive of virulence. Almost all type II strains (35/36) were non-virulent. In the same way, none of type III and Africa 4 strains exhibited virulence in any of the infected mice. In contrast, all mice that were infected by Africa 1 strains developed an acute and lethal toxoplasmosis.

Discussion

In the present study, most of *T. gondii* strains from Senegal could be unambiguously assigned to one of four clonal lineages: type II, type III, and Africa 1 lineages, in addition to a novel lineage inferred from microsatellite analysis and designated here for the first time as Africa 4 lineage. Strains belonging to this lineage were occasionally described in the literature by using RFLP markers under the genotype designation of ToxoDB#20 [4,22]. LD tests were statistically significant for all four groups, although sample sizes for each cluster were relatively low. Usually, large sample sizes are necessary to have the statistical power to reject the null hypothesis of random mating unless LD is very strong. Reaching statistical significance in LD testing for such small sample sizes indicates the robustness of the clonal structure of *T. gondii* populations from Senegal.

Within Senegal, the distribution of those four lineages displayed marked geographical pattern. In the port regions of Saint-Louis and Dakar, strains of type II lineage, followed by strains of type III and Africa 4 lineages, constituted the large majority of *T. gondii* strains. At the opposite, Africa 1 was by far the predominant lineage in the inland region of Kedougou.

The high prevalence of strains of Africa 1 lineage in both urban and rural localities of Kedougou indicates the occurrence of gene flow through terrestrial pathways between this region of Senegal and other regions of West Africa where Africa 1 is the predominant *T. gondii* lineage [4]. The introduction of this lineage in this region may have been caused by livestock transhumance, which is a millenary practice in these areas of the world. In this context, an animal that was infected in some area could be slaughtered or die hundreds of kilometers away. The carcass and offal of this animal, if consumed by local cats, could allow the introduction of strains of *T. gondii* into new remote areas. A possible scenario is an introduction of this lineage in Kedougou during the sedentarization of populations of Fulani nomads arriving in successive waves in this region with their livestock herds from South Mali (region of Bountou) since the end of the thirteenth century [23]. It is also possible that wildlife played a role in the regional dissemination of this lineage. In this study, an Africa 1 strain was isolated from a wild fowl of genus *Pternistis* in the region of Kedougou. It is unknown whether this wild fowl got infected from a domestic source of infection in the vicinity of human dwellings or if this lineage extensively circulates among wildlife in these areas. This later hypothesis would be consistent with an autochthonous occurrence of this lineage in Africa. Wild strains circulating in the Amazonian rainforest of French Guiana in South America are genetically divergent from those that infect humans in populated areas bordering the forest [24] and these wild strains have often been associated with more severe disease in immunocompetent patients [6,25]. This call for further research in Africa, especially for

collecting more strains from wildlife and characterizing the sylvatic cycle of *T. gondii* in this continent.

Concerning the Africa 4 lineage, its geographical pattern of distribution also suggests a terrestrial route of dissemination across an East-West axis linking Asia to Africa. Indeed, its RFLP equivalent ToxoDB#20 has been identified in China, Sri Lanka, Emirates, Egypt and Ethiopia [4,22]. In addition, the identification of strains of Africa 4 lineage in isolates of Malian and Gambian patients corroborates this scenario [4]. The caravans bringing diverse merchandise together with animals along the well-known Silk Road may have allowed the spread of this lineage between Asia and Northeast Africa. From this point, dissemination in Africa through Trans-Saharan trade or livestock transhumance may explain the pattern observed in the distribution range of the Africa 4 lineage but more isolates of this lineage in Africa and especially from countries of the Sahelian belt are needed to support this hypothesis.

In Senegal, deciphering the origin of type II and type III lineages in this country may be more challenging due to their transcontinental occurrence. In addition to a putative terrestrial propagation of these lineages following the same path as the Africa 4 lineage, an introduction from Europe — mediated by the invasive *M. m. domesticus* and *R. rattus* rodent species through maritime trade — appears to be a reasonable hypothesis given the predominance of these two lineages in Europe. Our results suggest that *T. gondii* type II strains from Senegal are more related to those from Western Europe than those from other areas in Africa. The port cities of Saint-Louis and Dakar are believed to be the introduction points of invasive European rodents [26–28], which may have allowed multiple transatlantic introductions of type II and type III strains in port localities. Moreover, these invasive rodents may have constituted important reservoirs of *T. gondii* in these newly founded localities. This may have given an initial advantage to imported strains over autochthonous African strains circulating in these areas. Later, the livestock chain linking inland regions to these urban poles [29] could have allowed gene flow between inland and coastal areas of the country. Since the 1930s, the development of the road infrastructure and the transport network has allowed a rapid inland dissemination of the invasive *M. m. domesticus* and *R. rattus*. Those species, which probably play a major role in *T. gondii* strains dissemination [13,15], rely on fast human means of transport like trucks for terrestrial propagation [30]. In this context, the road network development probably increased migration opportunities for *T. gondii* and contributed to the homogenization of *T. gondii* populations between the connected nodes of this network as previously shown in Gabon [17]. Kedougou region has long remained isolated from the transport network and was opened up more recently by the construction of a national road linking this area to the rest of the road network since 1998. This could explain the occurrence of strains with lineages other than Africa 1, such as Africa 4 and type II, only in urban localities of Kedougou that are more exposed to exchanges through the road network than rural localities.

In port regions of Senegal, if the high prevalence of type II lineage (and to lesser extent of type III lineage) can be attributed to an introduction of these lineages through transatlantic trade, the apparent higher prevalence of Africa 4 lineage compared to Africa 1 lineage in coastal regions is more questioning. Although the success of spread and establishment of a given lineage may be subject to random processes, it is unlikely that this mechanism solely explain the higher prevalence of Africa 4 lineage over Africa 1 lineage in both Saint-Louis and Dakar. There is experimental evidence that Africa 4, type II, and type III lineages differ markedly from Africa 1 lineage concerning mouse virulence. Africa 4, type II and type III lineages are non-virulent for laboratory mice [8,31] whereas Africa 1 lineage

leads to lethal infection in all infected mice independently from the inoculated dose of parasites [17]. Given that *M. m. domesticus* is the predominant commensal rodent in Dakar and Saint-Louis, we propose that this important *T. gondii* reservoir may favor the maintenance of non-virulent *T. gondii* strains in these regions, as it would die from infection by strains of the Africa 1 lineage. In contrast, the native African *Mastomys natalensis* exhibits resistance to *type I* strains [32], which share common virulence alleles with Africa 1 strains [33]. This native African rodent, being the predominant commensal species in Kedougou, may hence act as a competent reservoir for Africa 1 lineage in this region. This may explain the contrasted geographical structure in *T. gondii* populations between coastal and inland regions in this study, which appear to correlate spatially with host resistance.

The most important conclusion that can be drawn from our results is that the different patterns of virulence among *T. gondii* strains for various reservoir hosts may be a major bottleneck for domestic *T. gondii* strains, driving the persistence of only certain strains in the environment that will be available for human infection. In the context of our study in Senegal, the human-mediated invasion of the house mouse, in addition to its putative role in the introduction of type II and type III lineages in Senegal, may be responsible of the decline of *T. gondii* populations of Africa 1 lineage in invaded areas. Africa 1 lineage is one of the most prevalent lineages in West Africa, where high prevalence of ocular toxoplasmosis has been reported among patients from this region [11,12]. The possible involvement of Africa 1 lineage in this heightened incidence of ocular toxoplasmosis has been proposed in a recent review [4]. This hypothesis is supported by the genetic proximity between Africa 1 lineage and a number of strains from South America [34,35], the continent that suffers from the highest burden of ocular toxoplasmosis [5,9,36]. Our findings, by providing an accurate mapping of *T. gondii* lineages geographical distribution according to host species occurrence in Senegal, offer a valuable framework for epidemiological studies aiming to identify the parasite determinants of ocular toxoplasmosis.

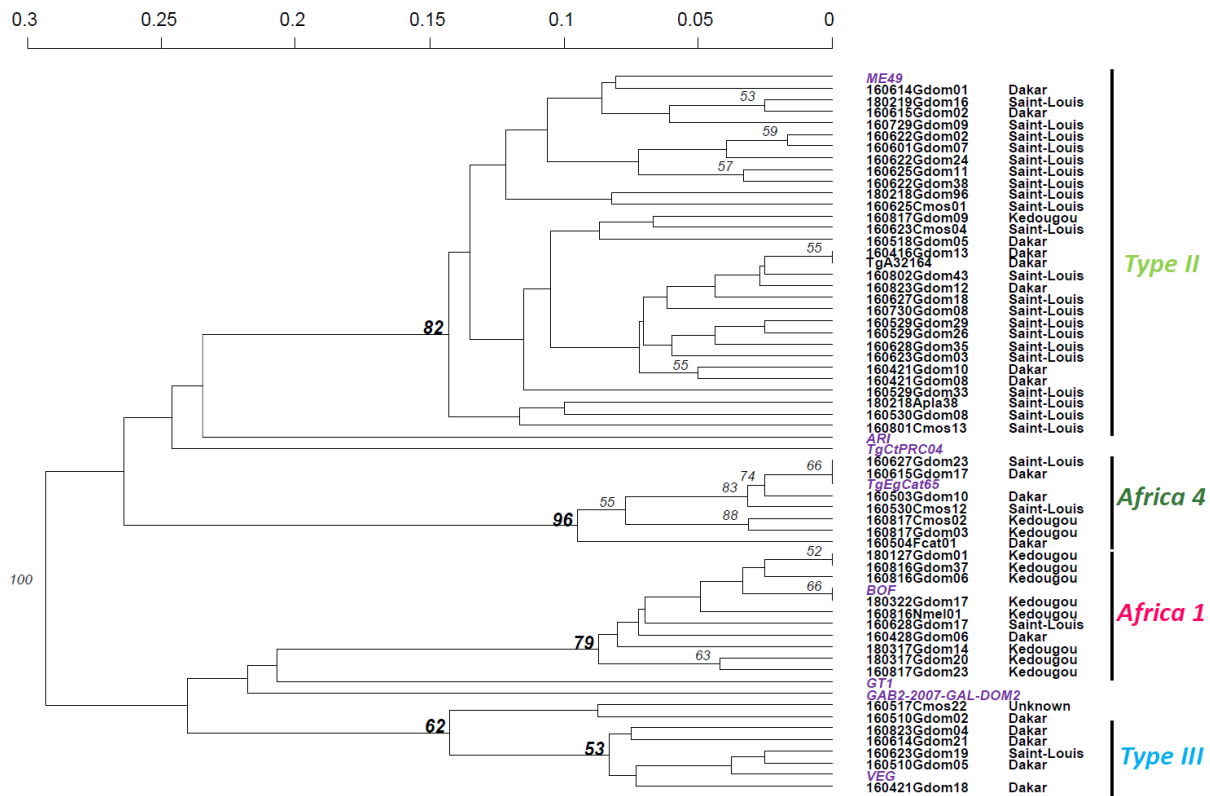


Fig 1. UPGMA dendrogram showing the assignment of Senegalese *Toxoplasma gondii* MLGs to clonal lineages. Senegalese MLGs and MLGs of the reference strains are labeled as in Table S2. Designations of reference strains are indicated in violet italic lettering. Duplicated genotypes were removed prior to analysis and are not indicated on the distance tree. The four clonal lineages identified among the Senegalese population are colour-coded (type II lineage in light green, Africa 4 lineage in dark green, Africa 1 lineage in rosy red and type III lineage in blue). Support values greater than 50% using 1,000 bootstrap samples are shown.

Table 1. Genetic diversity and linkage disequilibrium of the four lineages of *Toxoplasma gondii* defined by the UPGMA dendrogram.

	N	MLG	eMLG	SE	lambda	elambda	E.5	eE.5	la	p.la	rbarD	p.rD
Type II lineage	37	30	9.530	0.619	0.963	0.849	0.941	0.988	1.234	0.001	0.186	0.001
Africa 4 lineage	7	7	7.000	0.000	0.857	0.857	1.000	1.000	0.907	0.010	0.243	0.008
Africa 1 lineage	13	10	7.920	0.730	0.852	0.791	0.769	0.907	0.507	0.024	0.103	0.025
Type III lineage	9	7	7.000	0.000	0.840	0.810	0.932	0.942	0.828	0.004	0.119	0.004

N, census size; MLG, multilocus genotypes; eMLG, expected MLG based on rarefaction; SE, standard error from rarefaction; lambda, Simpson Index; elambda, Simpson Index based on rarefaction; E.5, Evenness; eE.5, Evenness based on rarefaction; la, IA; p.la, p-value for IA; rbarD, \bar{r} ; p.rD, p-value for \bar{r} .

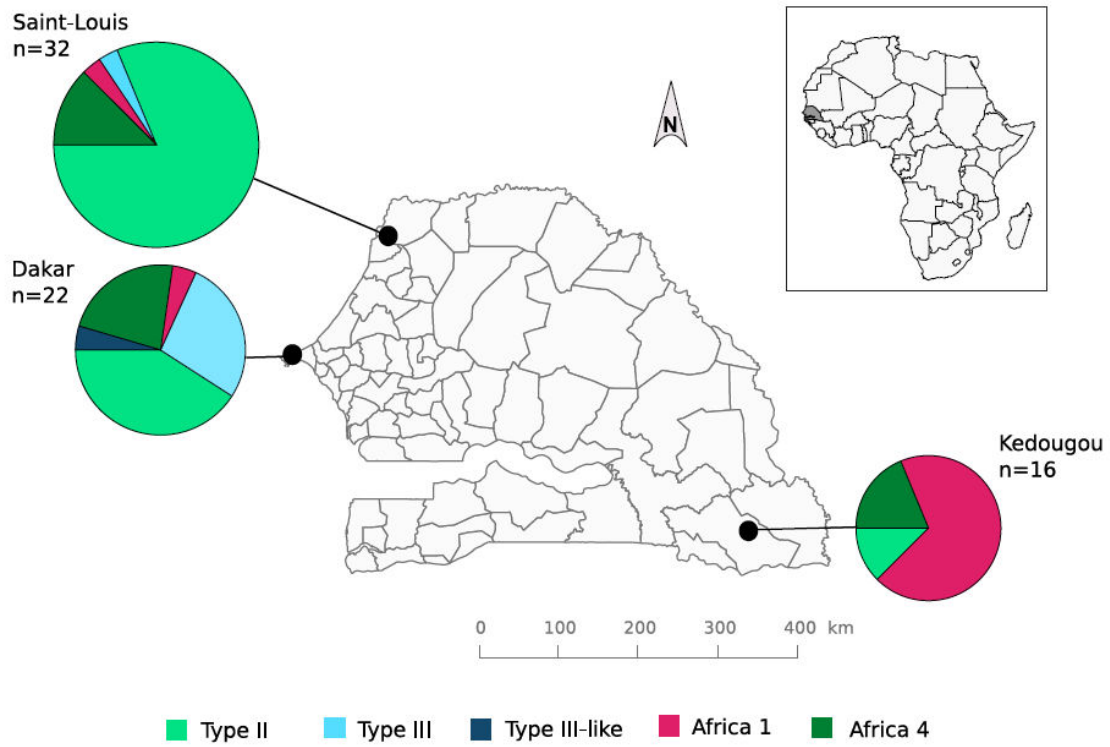


Fig. 2 Geographical distribution of Senegalese *Toxoplasma gondii* clonal lineages and strains. Black dots indicate regions from which *T. gondii* isolates were obtained and genotyped using 15 microsatellite loci. Sizes of pie charts correlate with total number of isolates (n), and colours indicate different clonal lineages and strains.

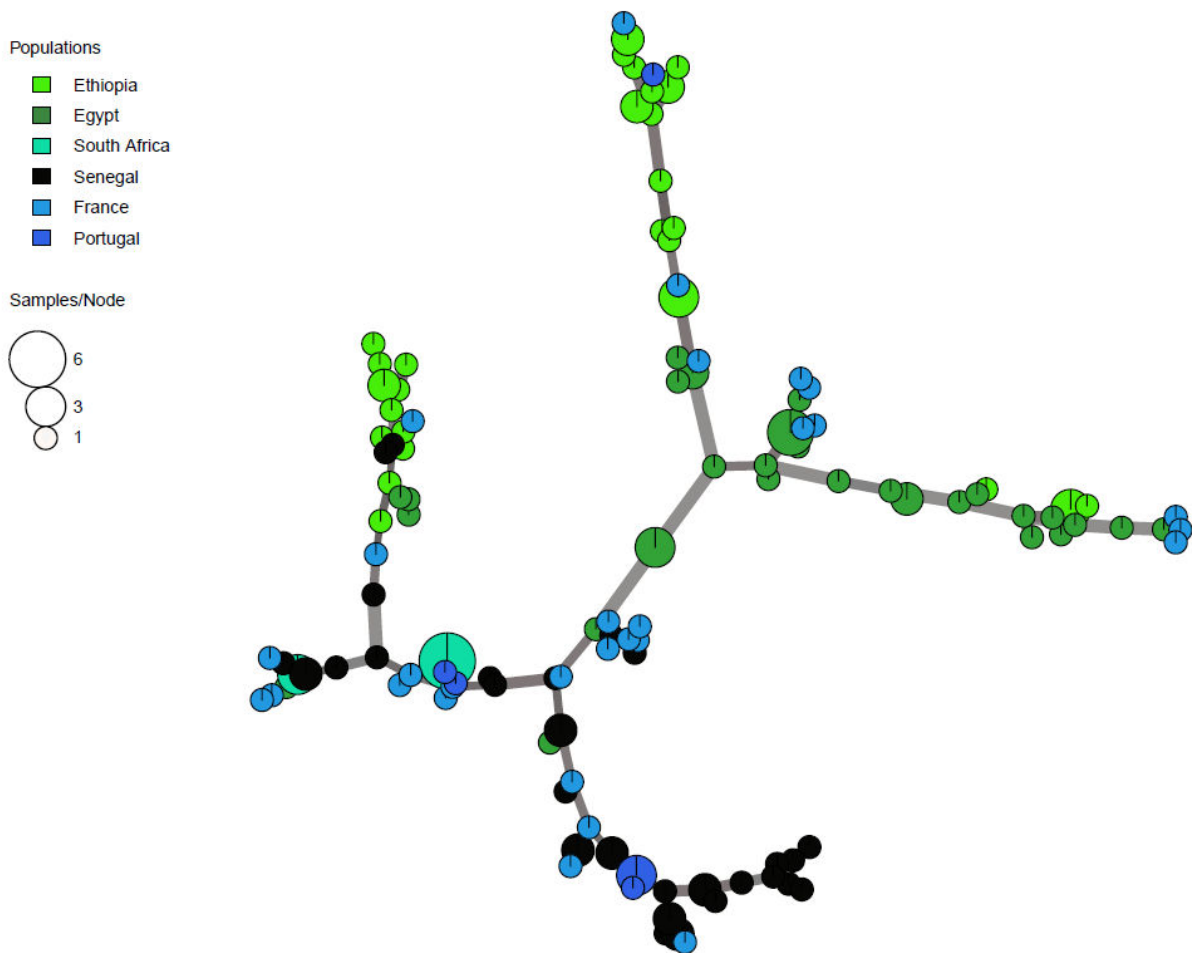


Fig 3. Minimum spanning network (MSN) showing the relationships between MLGs of type II lineage from Senegal, Western Europe, and Africa. MSNs are based on MLGs defined by 15 microsatellite markers. Each circle represents a unique MLG. The size of each circle corresponds to the number of individuals, and the colors indicate the geographical population at the country scale. Thick and dark lines show MLGs that are more closely related to each other.

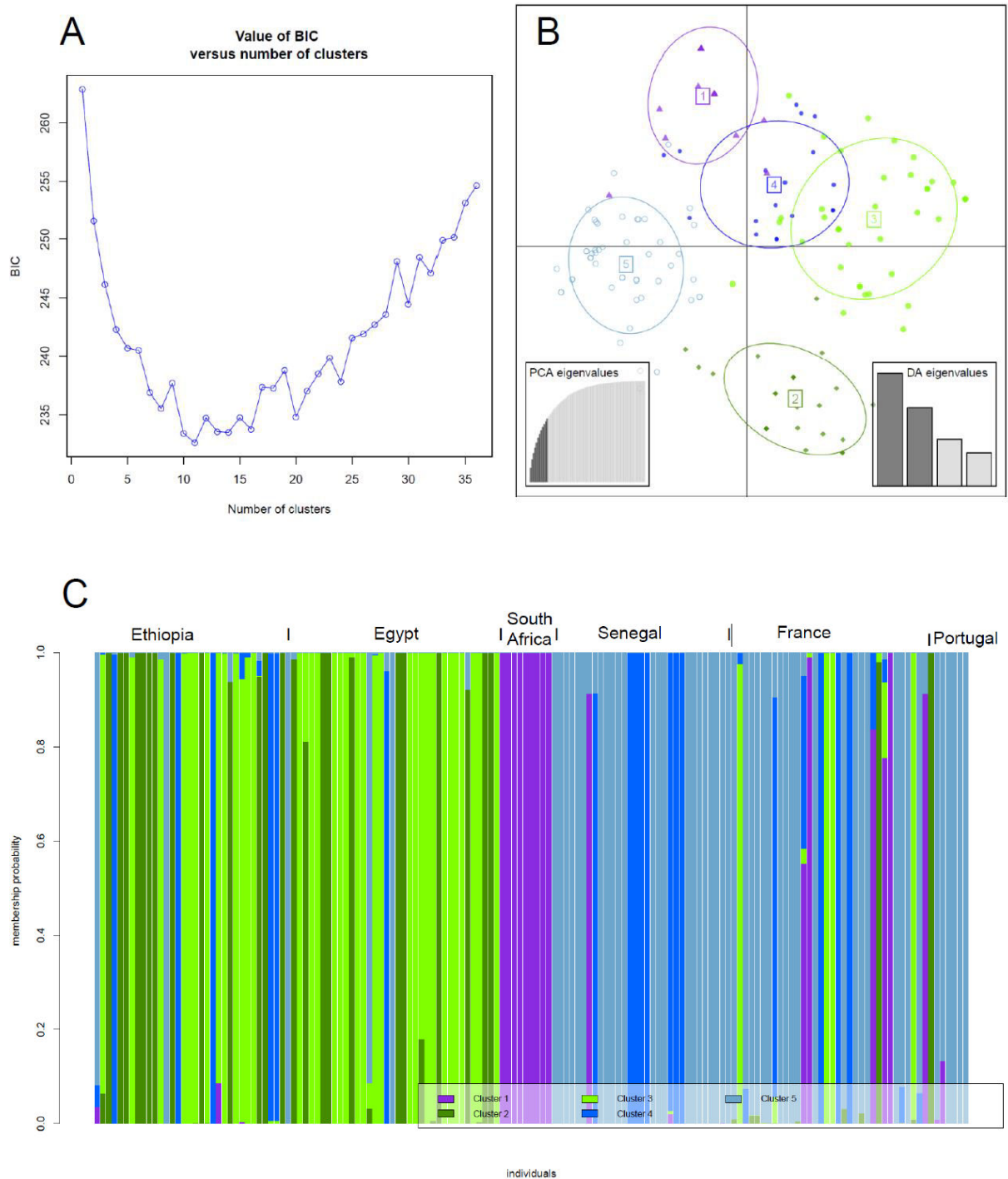


Fig 4. Genetic clustering of *Toxoplasma gondii* populations of type II lineage from Senegal, Western Europe, and Africa using the DAPC. (A) Bayesian information criterion (BIC) is provided for different numbers of clusters (from 1 to 35). (B) Scatterplot representing axes 1 and 2 of the discriminant analysis of PCA-transformed data (DAPC). Individual clones are indicated by dots. Numbers and colors represent the five genetic clusters retained from Bayesian information criterion (BIC) values. (C) Individual strains are aligned along the x-axis and grouped according to the country of origin. Strains are assigned either to one cluster (each cluster is represented by a different color) or to multiple clusters if their genotypes were admixed (indicated by multiple colors).

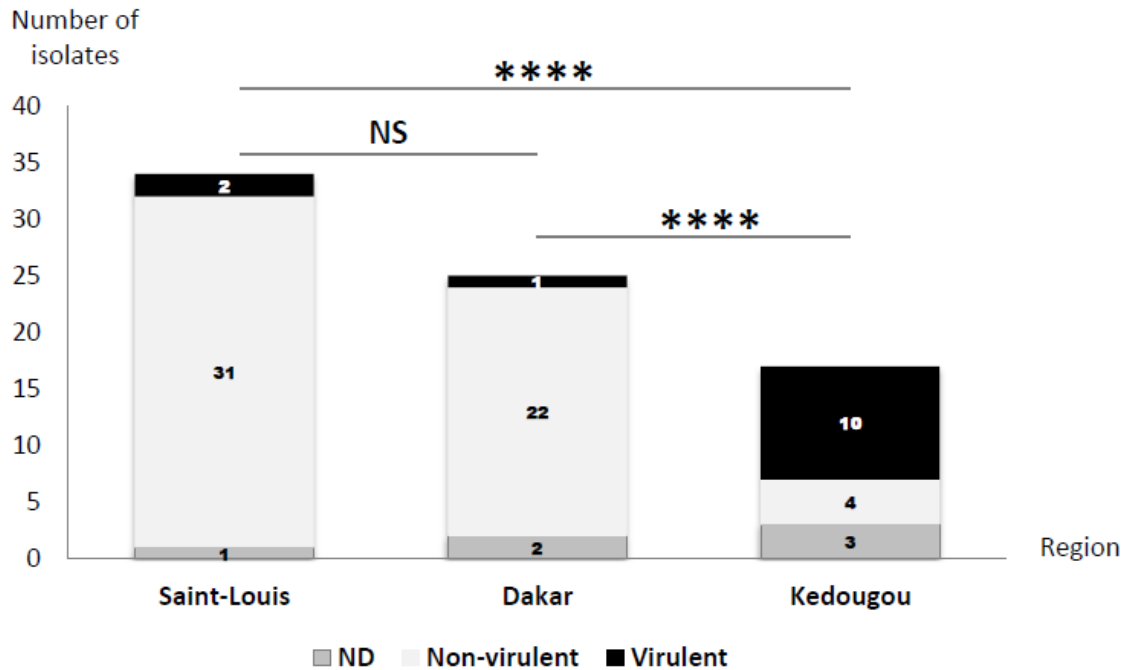


Fig 5. Regional variations in the mouse virulence of Senegalese *T. gondii* strains.

* P < 0.01; ** P < 0.001; *** P < 0.0001; **** P < 0.00001; NS, non-significant (P > 0.05); ND, not determined.

Funding

This work was supported by funds from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR project IntroTox 17-CE35-0004), the region of Limousin and the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Acknowledgements

We would like to thank the director of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Dakar Dr Laurent Vidal, the previous director of the Institut Pasteur de Dakar Dr André Spiegel and the current director Dr Amadou Sall for their collaboration. We thank Dr Laurent Granjon for his support in this study. We also thank the previous director of the Djoudj National Bird Sanctuary Mr. Ibrahima Gueye and the current director Mr. Issa Sidibé for their collaboration. We are very grateful to Martin Bendia for his help in the field study. We are very grateful to Mrs. Mbengue for her technical assistance. We thank the poultry owners in Senegal for their participation and for their help in the field study. We would like to thank Chunley Su for *T. gondii* DNA of TgCatEg65 strain from Egypt.

Transparency declarations

All of the authors declare no conflicts of interest.

References

1. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 1970;167: 893–896.
2. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2004;34: 1185–1196.
3. Shwab EK, Zhu X-Q, Majumdar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014;141: 453–461.
4. Galal L, Ajzenberg D, Hamidović A, Durieux M-F, Dardé M-L, Mercier A. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends Parasitol*. 2017;
5. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992;114: 136–144.
6. Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*. 2002;40: 4037–4044.
7. Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R, et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infect Dis*. 2006;12: 942–949.
8. Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite*. 2008;15: 366–371.
9. de-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, et al. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2541.
10. Xiao J, Yolken RH. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213: 828–845.
11. Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, et al. Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect*. 1999;123: 283–289.
12. Abu EK, Boampong JN, Amoabeng JK, Ilechie AA, Kyei S, Owusu-Ansah A, et al. Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis in Three Community Surveys in the Central Region of Ghana, West Africa. *Ophthalmic Epidemiol*. 2016;23: 14–19.
13. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103: 11423–11428.
14. Rosenthal BM. How has agriculture influenced the geography and genetics of animal parasites? *Trends Parasitol*. 2009;25: 67–70.
15. Shwab EK, Saraf P, Zhu X-Q, Zhou D-H, McFerrin BM, Ajzenberg D, et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018.

16. Dubey JP, Desmonts G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet J*. 1987;19: 337–339.
17. Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls A-L, Durand P, et al. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4: e876.
18. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé M-L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2010;48: 4641–4645.
19. Ajzenberg D, Collinet F, Aubert D, Villena I, Dardé M-L, French ToxoBs network group, et al. The rural-urban effect on spatial genetic structure of type II *Toxoplasma gondii* strains involved in human congenital toxoplasmosis, France, 2002-2009. *Infect Genet Evol*. 2015;36: 511–516.
20. Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*. 2014;2: e281.
21. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 2008;24: 1403–1405.
22. Chaichan P, Mercier A, Galal L, Mahittikorn A, Ariey F, Morand S, et al. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infect Genet Evol*. 2017;53: 227–238.
23. Le Bon G. Kédougou: aspects de l'histoire et de la situation socio-économique actuelle. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*. 1965;8: 167–230.
24. Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, de Thoisy B, Bonnabau H, et al. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol*. 2011;11: 1378–1387.
25. Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging Infect Dis*. 2009;15: 656–658.
26. Bonhomme F, Orth A, Cucchi T, Rajabi-Maham H, Catalan J, Boursot P, et al. Genetic differentiation of the house mouse around the Mediterranean basin: matrilineal footprints of early and late colonization. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2011;278: 1034–1043.
27. Konečný A, Estoup A, Duplantier J-M, Bryja J, Bâ K, Galan M, et al. Invasion genetics of the introduced black rat (*Rattus rattus*) in Senegal, West Africa. *Mol Ecol*. 2013;22: 286–300.
28. Lippens C, Estoup A, Hima MK, Loiseau A, Tatard C, Dalecky A, et al. Genetic structure and invasion history of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: a legacy of colonial and contemporary times. *Heredity (Edinb)*. 2017;119: 64–75.
29. Niang M, Mbaye M. Evolution des exportations de bétail malien au Sénégal suite aux récentes crises. 2013;

30. Dalecky A, Bâ K, Piry S, Lippens C, Diagne CA, Kane M, et al. Range expansion of the invasive house mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: a synthesis of trapping data over three decades, 1983–2014. *Mammal Review*. 2015;45: 176–190.
31. El Behairy AM, Choudhary S, Ferreira LR, Kwok OCH, Hilali M, Su C, et al. Genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates from stray dogs from Giza, Egypt. *Vet Parasitol*. 2013;193: 25–29.
32. Fujii H, Kamiyama T, Hagiwara T. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. *Jpn J Med Sci Biol*. 1983;36: 343–346.
33. Khan A, Taylor S, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLoS Genet*. 2009;5: e1000404.
34. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé M-L, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109: 5844–5849.
35. Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun*. 2016;7: 10147.
36. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2: e277.

Environment	Species	number of sampled individuals	number of bioassay trials	number of isolates	
Domestic	Chicken <i>Gallus domesticus</i>	1621	105	61	
	Domestic muscovy duck <i>Cairina moschata</i>	303	15	11	
	Mallard duck <i>Anas platyrhynchos</i>	3	1	1	
	Turkey <i>Meleagris gallopavo</i>	25	0	-	
	Guinea fowl <i>Numida meleagris</i>	13	1	1	
	Goose <i>Anser anser</i>	2	0	0	
	Cat <i>Felis catis</i>	5	3	1	
	Sheep <i>Ovis aries</i>	1	1	1	
	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	1	0	-	
	Pied Crow <i>Corvus albus</i>	2	2	0	
	Black kite <i>Milvus migrans</i>	2	2	0	
	Spur-winged goose <i>Plectropterus gambensis</i>	1	0	-	
	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	3	0	-	
	Wild	Orange Weaver <i>Ploceus auranlius</i>	1	0	-
Hare <i>Lepus</i> spp		1	0	-	
African wildcat <i>Felis silvestris lybica</i>		1	1	0	
Dove <i>Spilopelia</i> spp		1	1	0	
Coucal <i>Centropus</i> spp		1	1	0	
Rail <i>Rallus</i> spp		2	1	0	
Striped polecat <i>Ictonyx striatus</i>		1	1	0	
Pale fox <i>Vulpes pallida</i>		1	1	0	
Jackal <i>Canis aureus anthus</i>		2	2	0	
Garganey <i>Spatula querquedula</i>		28	8	0	
Francolin <i>Pternistis bicalcaratus</i>		12	4	1	
Common warthog <i>Phacochoerus africanus</i>		5	3	0	
African civet <i>Civettictis civetta</i>		1	1	0	
Kob <i>Kobus kob</i>		1	1	0	
Total			2040	155	77

Table S1. Summary of sampled animal species, bioassay trials and collected isolates.

Strain ID	BRC <i>Toxoplasma</i> ID	Host species	Origin	Lineage / RFLP equivalent genotype	TUB2	W35	TgM- A	B18	B17	M33	MIV.1	MXI.1	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83	Latitude	Longitude	Refer- ences
GT1		Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	USA	Type I / ToxoDB#10	291	248	209	160	342	169	274	358	209	168	145	119	265	87	306			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
ME49		Sheep <i>Ovis aries</i>	USA	Type II / ToxoDB#1	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	91	310			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
VEG		Human (AIDS)	USA	Type III / ToxoDB#2	289	242	205	160	336	165	278	356	213	188	153	111	267	89	312			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
FOU		Human (transplant)	France (African patient)	Africa 1/Brl / ToxoDB#6	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	281	89	306			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
ARI		Human (transplant)	USA	Type 12 / ToxoDB#5	289	242	209	158	336	169	274	362	215	170	147	131	295	89	316			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
TgCiPRC04		Cat <i>Felis silvestris catus</i>	China	Chinese 1 / ToxoDB#9	293	242	211	160	336	169	274	354	215	172	145	123	281	93	308			Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016
TgA105004		Chicken <i>Gallus gallus</i>	Gabon	Africa 3 / ToxoDB#203	291	242	207	160	342	165	278	354	223	166	142	111	277	97	310			Su et al., 2012;

		<i>domesticus</i>																			Lorenzi et al., 2016		
TgEgCat65		<i>Cat Felis silvestris catus</i>	Africa 4 / Egypt	ToxoDB#20	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	303	99	310		Al-Kappany et al., 2010		
160316Gdom02	TgA 117001	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	NA (0/15)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-16.34984	16.09297	this study
160316Gdom03	TgA 117002	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Africa 4 (5/15)	291	242		NA	156	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	303	99	NA		-16.34984	16.09297	this study
160504Fcat01	TgA 117003	<i>Cat Felis silvestris catus</i>	Dakar, Senegal	Africa 4	293	242	203	156	336	165	274	354	217	174	130	109	281	101	306		14.73159	-17.43315	this study
160430Oari01	TgA 117004	Sheep <i>Ovis aries</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	269	109	308		-17.40816	14.74011	this study
160416Gdom13	TgA 117005	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	269	107	308		14.74339	-17.41907	this study
160416Gdom14	TgA 117006	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	269	107	308		14.74339	-17.41907	this study
160421Gdom08	TgA 117007	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	279	123	308		14.71848	-17.43277	this study
160421Gdom10	TgA 117008	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	283	127	308		14.71848	-17.43277	this study
160421Gdom18	TgA 117009	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	188	151	111	275	91	312		14.71940	-17.43608	this study
160428Gdom06	TgA 117010	Chicken	Dakar,	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	166	145	111	269	89	306		14.80638	-17.28409	this study

		<i>Gallus gallus domesticus</i>	Senegal																				
160503Gdom10	TgA 117011	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	301	99	310	14.77719	-17.18335	this study	
160510Gdom02	TgA 117012	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type III-like	289	248	205	160	336	165	278	354	213	190	149	111	265	89	306	14.67231	-17.44223	this study	
160510Gdom05	TgA 117013	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	188	153	111	267	89	312	14.67231	-17.44223	this study	
160511Gdom06	TgA 117014	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	188	153	111	267	89	312	14.67124	-17.44297	this study	
160517Cmos22	TgA 117015	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	NA	Type III-like	289	242	205	160	336	165	278	354	213	166	147	111	267	89	306	14.70952	-17.45561	this study	
160517Gdom02	TgA 117016	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	316	101	310	14.70952	-17.45561	this study	
160517Cmos23	TgA 117017	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	Dakar, Senegal	Africa 4 (8/15)	291	242	NA	156	NA	NA	274	354	223	174	NA	NA	NA	NA	310	14.70952	-17.45561	this study	
160517Cmos30	TgA 117018	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	Dakar, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	316	101	310	14.70952	-17.45561	this study	
160518Gdom05	TgA 117019	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	229	174	140	119	273	121	308	14.77545	-17.18494	this study	
160529Gdom26	TgA 117020	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	231	174	140	111	275	105	308	16.02016	-16.49351	this study	

160529Gdom29	TgA 117021	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	229	174	140	111	275	105	308	16.02047	-16.49342	this study
160529Gdom33	TgA 117022	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	235	174	140	127	271	99	308	16.02025	-16.49390	this study
160529Gdom37	TgA 117023	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	NA (0/15)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16.02025	-16.49390	this study
160529Gdom42	TgA 117024	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	235	174	140	127	271	99	308	16.02025	-16.49390	this study
160530Cmos12	TgA 117025	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	Saint-Louis, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	312	99	310	16.00943	-16.48549	this study
160530Gdom08	TgA 117026	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	217	174	142	133	267	97	308	16.00795	-16.48551	this study
160601Gdom07	TgA 117027	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	244	207	158	336	169	274	356	215	176	140	113	259	97	310	16.01113	-16.49055	this study
160614Gdom01	TgA 117028	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	217	174	140	111	275	85	310	14.79834	-17.18688	this study
160614Gdom21	TgA 117029	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	149	111	267	91	312	14.79777	-17.18527	this study
160615Gdom02	TgA 117030	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	217	174	140	113	259	89	310	14.80592	-17.18358	this study
160615Gdom14	TgA 117031	Chicken <i>Gallus gallus</i>	Dakar, Senegal	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	149	111	267	91	312	14.80703	-17.18314	this study

<i>domesticus</i>																						
160615Cmos01	TgA 117032	Muscovy duck <i>Carina</i> <i>Moschata</i>	Dakar, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	307	103	310	14.80675	-17.18309	this study
160615Gdom17	TgA 117033	Chicken <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i>	Dakar, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	305	101	310	14.80729	-17.18278	this study
160622Gdom02	TgA 117034	Chicken <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	244	207	158	336	169	274	356	215	176	140	113	259	97	312	16.03601	-16.50503	this study
160622Gdom24	TgA 117035	Chicken <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	244	207	158	336	169	274	356	215	176	140	113	259	103	310	16.03601	-16.50503	this study
160622Gdom38	TgA 117036	Chicken <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	244	207	158	336	169	274	356	213	176	140	113	275	99	310	16.03601	-16.50503	this study
160623Gdom03	TgA 117037	Chicken <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	225	174	140	111	275	121	308	16.03601	-16.50503	this study
160623Cmos04	TgA 117038	Muscovy duck <i>Carina</i> <i>Moschata</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	223	174	140	119	261	103	308	16.03601	-16.50503	this study
160623Gdom08	TgA 117039	Chicken <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	223	174	140	119	261	103	308	16.03601	-16.50503	this study
160623Gdom19	TgA 117040	Chicken <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	192	153	111	269	89	312	16.03601	-16.50503	this study
160625Cmos01	TgA 117041	Muscovy duck <i>Carina</i> <i>Moschata</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	237	176	140	113	279	95	310	16.01963	-16.50519	this study
160625Gdom11	TgA 117042	Chicken	Saint-	Type II	289	244	207	158	336	169	274	356	213	176	140	113	259	99	310	16.01963	-16.50519	this study

		<i>Gallus gallus domesticus</i>	Louis, Senegal																			
160627Gdom14	TgA 117043	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	244	207	158	336	169	274	356	213	176	140	113	259	99	310	16.02063	-16.50823	this study
160627Gdom18	TgA 117044	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	219	174	140	111	269	107	308	16.02063	-16.50823	this study
160627Gdom19	TgA 117045	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	225	174	130	109	310	101	310	16.02063	-16.50823	this study
160627Gdom23	TgA 117046	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	225	174	130	109	303	99	310	16.02063	-16.50823	this study
160628Gdom17	TgA 117047	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	269	89	304	16.04635	-16.50599	this study
160628Gdom28	TgA 117048	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	303	101	310	16.04635	-16.50599	this study
160628Gdom35	TgA 117049	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	229	174	140	111	275	113	308	16.04635	-16.50599	this study
160729Gdom09	TgA 117050	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	140	117	261	97	308	16.35041	-16.27594	this study
160729Gdom25	TgA 117051	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	140	117	261	97	308	16.35041	-16.27594	this study
160730Gdom08	TgA 117052	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	273	101	308	16.33172	-16.29414	this study

160730Gdom13	TgA 117053	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	273	101	308	16.33172	-16.29414	this study
160801Cmos13	TgA 117054	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	217	174	145	119	275	95	314	16.47514	-16.27608	this study
160802Gdom43	TgA 117055	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Saint-Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	229	174	140	111	269	105	308	16.46689	-16.28363	this study
160816Gdom06	TgA 117056	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306	12.55556	-12.20505	this study
160816Gdom37	TgA 117057	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	271	89	306	12.55556	-12.20505	this study
160816Nmel01	TgA 117058	Guinea fowl <i>Numida meleagris</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	164	149	111	273	89	306	12.56224	-12.18616	this study
160817Gdom03	TgA 117059	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	221	174	130	109	310	105	310	12.55358	-12.18383	this study
160817Cmos02	TgA 117060	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	Kedougou, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	219	174	130	109	310	95	310	12.55358	-12.18383	this study
160817Cmos03	TgA 117061	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	Kedougou, Senegal	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	221	174	130	109	310	103	310	12.55358	-12.18383	this study
160817Gdom09	TgA 117062	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	176	140	119	261	101	308	12.55148	-12.18584	this study
160817Gdom21	TgA 117063	Chicken <i>Gallus gallus</i>	Kedougou, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	176	140	119	261	101	308	12.55112	-12.18458	this study

					<i>domesticus</i>																		
160817Gdom23	TgA 117064	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	145	111	279	89	308	12.55112	-12.18458	this study	
160823Gdom04	TgA 117065	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	190	149	111	273	89	312	14.66602	-17.39836	this study	
160823Gdom12	TgA 117066	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	227	174	140	111	269	113	308	14.66602	-17.39836	this study	
160823Gdom29	TgA 117067	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Dakar, Senegal	Type III (5/15)	NA	NA	NA	160	336	165	NA	NA	209	190	NA	NA	NA	NA	NA	14.66770	-17.39890	this study	
180127Gdom01	TgA 117068	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	271	87	306	12.63471	-12.24987	this study	
180128Gdom04	TgA 117069	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306	12.55302	-12.17733	this study	
180127Cmos02	TgA 117070	Muscovy duck <i>Carina Moschata</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306	12.55302	-12.17733	this study	
180322Gdom17	TgA 117071	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	271	89	306	12.54298	-12.29722	this study	
180317Gdom14	TgA 117072	Chicken <i>Gallus gallus domesticus</i>	Kedougou, Senegal	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	111	275	91	306	12.55263	-12.17735	this study	
180218Apla38	TgA 117073	Duck <i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	Saint- Louis, Senegal	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	213	174	140	117	269	95	312	16.47972	-16.02409	this study	
180317Gdom20	TgA 117074	Chicken	Kedougou,	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	281	89	310	12.55302	-12.17733	this study	

		<i>Gallus gallus</i>	Senegal																				
		<i>domesticus</i>																					
		Chicken	Saint-																				
180218Gdom96	TgA 117075	<i>Gallus gallus</i>	Louis,	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	223	176	142	113	279	85	310	16.47972	-16.02409	this study	
		<i>domesticus</i>	Senegal																				
		Chicken	Saint-																				
180219Gdom16	TgA 117076	<i>Gallus gallus</i>	Louis,	Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	140	115	259	89	310	16.47972	-16.02409	this study	
		<i>domesticus</i>	Senegal																				
		Francolin																					
180129Pbic09	TgA 117077	<i>Pternistis</i>	Kedougou,	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306	16.46506	-16.46506	this study	
		<i>bicalcaratus</i>	Senegal																				

Table S2. Genotyping results of *Toxoplasma gondii* DNA with 15 microsatellite markers from 77 strains collected in Senegal and from 8 reference strains collected in America, Africa, Asia, and Europe.

IV.2. Principaux résultats

Au total, 77 souches de *T. gondii* ont été isolées au cours de cette étude de terrain, la majorité provenant de volailles domestiques.

- Soixante-douze génotypes ont ainsi pu être caractérisés par l'analyse de 15 marqueurs microsatellites. La majorité de ces génotypes (70/72) se sont réparties en 4 groupes bien distincts correspondant à 4 lignées clonales. Trois de ces lignées, type II, type III et Africa 1, étaient déjà bien connues dans la littérature. La quatrième lignée, désignée ici pour la première fois par l'appellation « Africa 4 », avait déjà été isolée dans le cadre de plusieurs études (en Chine, Sri Lanka, Emirats, Egypte et Ethiopie) qui employaient le génotypage par RFLP multilocus et elle portait l'appellation « ToxoDB#20 ». Dans cette étude, le génotype par analyse microsatellite d'une souche ToxoDB#20 d'Egypte (TgCatEg65) a permis de faire le lien entre ces souches appartenant à une même lignée mais génotypées par deux techniques différentes. Ce résultat met en évidence l'étendue de l'aire de distribution de cette lignée, qui n'a jamais été observée en Europe, mais qui se retrouve en Asie et en Afrique, de la Chine au Sénégal, le long d'un axe Est-Ouest. Le génotypage microsatellite de souches ToxoDB#20 issus de plusieurs populations géographiques permettra de confirmer la correspondance entre la lignée microsatellite Africa 4 et la lignée RFLP ToxoDB#20.
- Un fort contraste géographique a été observé dans la distribution de ces quatre lignées entre les régions côtières de Saint-Louis et de Dakar, d'une part, et la région de Kédougou à l'intérieur des terres, d'autre part. La lignée type II, suivie des lignées type III et Africa 4, étaient prédominantes à Saint-Louis et à Dakar. A l'opposé, la lignée Africa 1 était de loin la plus fréquente à Kédougou. Dans cette région, cette lignée a également été isolée à partir d'un « Francolin », perdrix sauvage (*Pternistis bicalcaratus*), ce qui renforce l'aspect autochtone de cette lignée en Afrique.
- Seules les souches de type II étaient en effectif suffisant pour envisager une comparaison entre la population du Sénégal et d'autres populations géographiques de la même lignée. Globalement, les souches de type II du Sénégal étaient génétiquement plus proches des souches de type II d'Europe de l'Ouest que des souches de type II d'Afrique. Ce résultat suggère une origine européenne de cette lignée majeure au Sénégal, et son introduction via le commerce maritime. La proximité génétique entre les souches de type II de France et les souches de type II de la ville de Saint-Louis suggère une introduction liée au commerce maritime passé car le port de Saint-Louis n'existe plus depuis plus de 60 ans.
- Si la prévalence plus élevée de souches de type II et de type III au niveau des zones portuaires du Sénégal peut s'expliquer par leur introduction via le commerce maritime, celle de souches Africa 4, plus fréquentes à Dakar et à Saint-Louis comparées aux souches Africa 1 est plus délicate à interpréter. Chez la souris de laboratoire, les lignées type II, type III et Africa 4 sont avirulentes, alors que la lignée Africa 1 tue systématiquement la souris, indépendamment de la dose de parasites inoculée (Mercier et al., 2010). Si des résultats obtenus chez des lignées de souris de laboratoires ne sont pas directement transposables aux populations naturelles de souris, l'hypothèse que ces relations lignée-dépendante entre les souris et *T. gondii* soient également valables en condition naturelle ne peut être écartée. Dans ce schéma, la souris *M. m. domesticus*, petit mammifère commensal le plus abondant à Dakar et à Saint-Louis, constituerait un bon réservoir des lignées type II, type III et Africa 4 et contre-sélectionnerait la lignée Africa 1. Cette hypothèse constitue une explication plausible à la rareté de la lignée Africa 1 à

Dakar et à Saint-Louis (isolée une seule fois dans chacune des deux régions) par rapport aux trois autres lignées. Elle avait déjà été isolée chez deux petits mammifères africains de la ville de Dakar (cf Chapitre III), ce qui suggère un rôle des espèces natives dans le maintien de sa transmission. Dans le même sens, les résultats d'une étude expérimentale suggèrent que *Mastomys natalensis*, le rongeur commensal le plus abondant à Kédougou, en étant résistant aux souches virulentes de type I, pourrait être également résistant à la lignée Africa 1 qui possède de nombreux allèles de type I, et constituerait de ce fait un réservoir compétent de cette lignée (Fujii et al., 1983). Ces résultats laissent à penser que les différentes espèces de rongeurs commensaux exercent des pressions de sélection importante sur les populations de *T. gondii*. Cela pourrait être un mécanisme majeur de l'évolution de la structure des populations du parasite.

Chapitre V. Discussion générale

Les objectifs de cette thèse étaient de mieux comprendre le rôle potentiel de la globalisation des échanges humains dans l'évolution de la structure des populations du parasite *T. gondii*. Nous avons voulu évaluer dans quelle mesure les invasions de rongeurs qui accompagnent ces échanges contribuent à cette évolution. Si un rôle de ces réservoirs clés de *T. gondii* dans la structuration des populations du parasite a déjà été proposé dans la littérature, ce travail de thèse a permis pour la première fois de tester cette hypothèse. Les questions de recherches spécifiques auxquelles nous nous sommes attachés à répondre concernaient le rôle potentiel des rongeurs invasifs dans les migrations transcontinentales de souches de *T. gondii* et leur rôle dans la sélection (ou la contre-sélection) des souches autochtones au niveau des régions envahies. Au Sénégal, un pays longtemps au cœur du commerce colonial, nous avons tenté de comparer la diversité des souches de *T. gondii* qui circulent chez les rongeurs invasifs de la ville portuaire de Dakar avec celles qui circulent chez les espèces autochtones africaines de cette même ville. Nous avons également comparé les souches qui circulent chez la faune domestique dans les régions portuaires du Sénégal, où les rongeurs invasifs sont devenus majoritaires, à celles des localités isolées à l'intérieur du pays, là où les espèces de rongeurs autochtones demeurent prédominantes. En absence d'une vision claire sur la diversité génétique de *T. gondii* en Afrique, et afin de poser le contexte général de ces études, une revue de la littérature portant sur la diversité génotypique des souches de *T. gondii* en Afrique a été réalisée en amont de ces travaux.

V.1. Approches méthodologiques

Nous discutons dans cette partie des approches méthodologiques employées au cours de cette thèse pour l'étude de la diversité génétique de *T. gondii* au Sénégal dans le cadre des objectifs que nous avons synthétisé au début de ce chapitre.

V.1.1. Approches méthodologiques : Les sources de prélèvements

Toxoplasma gondii étant un parasite essentiellement tissulaire, des prélèvements de tissus post-mortem sont quasiment obligatoires pour l'isolement de souches. Chez l'homme, la réalisation de biopsies ne se justifie en effet que dans des cas très particuliers, comme par exemple lors de biopsies cérébrales chez des patients immunodéprimés avec abcès cérébral qui ne s'améliorent pas sous traitement spécifique anti-toxoplasmique (Ajzenberg et al., 2016). Chez l'animal, la réalisation de biopsie ne permettrait pas, de toute façon, de prélever des quantités suffisantes de tissus pour le génotypage de la souche infectante. Afin d'obtenir des échantillons de tissus prélevés post-mortem chez des animaux infectés par *T. gondii*, plusieurs stratégies d'échantillonnage sont possibles, chacune présentant des avantages et des limites.

V.1.1.1. Les captures de rongeurs

Les rongeurs sont reconnus comme ayant une importance clé dans le cycle de *T. gondii* et constituent probablement le réservoir principal du parasite en milieu domestique (Dubey et al., 1995; Hejlícek et al., 1997). Au vu de la problématique générale de la thèse, la capture de rongeurs apparaissait *a priori* comme la stratégie d'échantillonnage la mieux adaptée pour répondre à nos objectifs. L'abondance des rongeurs dans différents types de milieux et leur statut de nuisibles rend l'obtention de prélèvements relativement accessible au travers de campagnes de piégeage. Cependant, si un grand nombre d'individus est souvent capturé, la

prévalence de l'infection par *T. gondii* est généralement faible (Gotteland et al., 2014). De plus, le screening sérologique donne des résultats dont la fiabilité est limitée, comme nous l'avons montré dans le chapitre 3 de la thèse. Si l'objectif du protocole adopté est l'isolement de souches vivantes du parasite, des techniques plus contraignantes et surtout plus longues à mettre en place, comme la détection moléculaire par PCR s'avèrent alors nécessaires pour identifier les individus infectés en amont, ce qui peut affecter la viabilité des kystes dans les prélèvements de tissus.

Dans le cadre de notre thèse : La première étude de terrain, présentée dans le chapitre 3 de la thèse, s'est basée sur le génotypage direct des souches qui infectent chroniquement les petits mammifères invasifs et autochtones capturés. En effet, l'isolement des souches sur souris de laboratoire aurait été très difficile d'un point de vue logistique sur le terrain au Sénégal, du fait de l'absence de techniques de screening rapides et fiables chez les rongeurs. De plus, l'absence de personnel formé à l'isolement de souches durant la majeure partie de la période où les campagnes de piégeage ont été conduites n'a pas permis de l'envisager. Dans cette étude, les cerveaux des petits mammifères capturés ont été prélevés et stockés à -20°C au centre IRD de Dakar avant d'être acheminés vers notre laboratoire de Limoges. A Limoges, une estimation de la charge parasitaire contenue dans le cerveau a été réalisée par qPCR après extraction de l'ADN et le génotypage a été tenté quand la charge était suffisamment élevée ($C_t \leq 32$). Pour tester l'hypothèse d'adaptations hôtes/souches différentes entre les espèces de petits mammifères partageant le même environnement, des effectifs conséquents de souches de *T. gondii* génotypées pour chaque espèce étaient nécessaires pour pouvoir réaliser des tests statistiques. Au total, le génotypage par analyse multilocus de marqueurs microsatellites n'a pu être réussi que pour 12 des 110 individus positifs en qPCR. Les charges parasitaires relevées chez les 4 espèces de petits mammifères considérées dans cette étude étaient donc de manière générale insuffisantes pour le génotypage par microsatellites. Les autres techniques de génotypages disponibles (RFLP ou MLST), dont la sensibilité est comparable à celle des microsatellites, n'auraient également pas permis d'obtenir des résultats plus probants dans la plupart des cas (Ajzenberg et al., 2010; Su et al., 2010). Si des différences dans la diversité des souches entre la souris invasive, d'une part, et les espèces autochtones *C. gambianus* et *C. olivieri*, d'autre part, ont pu être relevées à Dakar et allaient dans le sens de l'hypothèse posée, les effectifs testés n'étaient pas suffisants pour espérer atteindre la significativité statistique.

V.1.1.2. L'échantillonnage de volailles domestiques

Les volailles domestiques élevées en plein air, et en particulier les poules, sont considérées comme de bons bio-indicateurs des souches de *T. gondii* qui circulent à une échelle locale (Dubey et al., 2015). Ces animaux côtoient souvent des chats domestiques dans un espace de vie généralement restreint. De plus, les volailles domestiques sont rarement sujettes à des formes sévères de toxoplasmose suite à leur infection (Dubey, 2009) et développent généralement une infection chronique aux différentes souches de *T. gondii*. De ce fait, les souches de *T. gondii* qui infectent les volailles reflètent vraisemblablement les souches disséminées par les chats dans leur environnement commun. En outre, la sérologie par MAT a été validée pour les poules dans plusieurs études (Casartelli-Alves et al., 2014; J. P. Dubey et al., 2016; Schares et al., 2018), ce qui permet de déterminer de manière fiable le statut infectieux de la volaille domestique en vue de les sélectionner pour le protocole d'isolement de souches mais qui peut être cependant limité par plusieurs obstacles. En effet, les élevages de volailles domestiques en plein air ne sont pas présents partout, en particulier en milieu urbain et l'échantillonnage des volailles domestiques est conditionné par l'accord de leurs propriétaires. Un travail de sensibilisation en amont des prélèvements est donc nécessaire.

Dans le cadre de notre thèse : Au Sénégal, l'élevage traditionnel de volailles est très répandu en milieu rural. En milieu urbain, nous avons observé des différences notables dans les modes d'élevage entre les trois villes échantillonnées (Dakar, Saint-Louis et Kédougou). Si l'élevage traditionnel de volailles en liberté ou semi-liberté était très répandu à Saint-Louis et Kédougou, l'élevage en confinement était plus commun à Dakar. Ce

dernier mode d'élevage, qui limite le contact des volailles avec les chats et leur environnement, est souvent lié à des prévalences très faibles voire nulles de l'infection à *T. gondii*. Cet aspect a rendu l'obtention de souches dans la ville de Dakar particulièrement difficile et l'échantillonnage de cette ville s'est étalé sur une période plus longue que celui conduit à Saint-Louis, par exemple, pour, au final, un rendement plus faible (deux mois pour 13 souches isolées à Dakar contre 3 semaines pour 24 souches isolées à Saint-Louis). Globalement, la coopération des propriétaires a été excellente, ce qui nous a grandement facilité l'accès aux prélèvements. En revanche, la prévalence très faible de l'infection chez les volailles (10,6%) nous a contraint à réaliser un très grand nombre de prélèvements de sang (n=1968) pour identifier les volailles séropositives. Egalement, un grand nombre de volailles trouvées séropositives étaient en phases de couaison ou d'élevage de poussins, ce qui a significativement restreint nos possibilités dans l'achat des poules séropositives pour l'isolement de souches. Au final, sur 1968 volailles prélevées, 208 ont été trouvées séropositives, 122 ont pu être achetées pour le protocole d'isolement de souches et 69 souches ont été obtenues.

V.1.1.3. L'échantillonnage d'animaux retrouvés morts en bord de route

Une stratégie d'échantillonnage que nous avons employée ponctuellement pour l'isolement de souches était le prélèvement d'animaux retrouvés morts en bord de route. Cette approche opportuniste a le principal avantage d'être l'un des seuls moyens d'isoler des souches à partir de certaines espèces d'animaux sauvages en dehors de la chasse officielle. La fraîcheur de la carcasse est une condition nécessaire au succès de l'isolement. Les principales contraintes liées à cette approche sont la difficulté à obtenir des échantillons de sérum de qualité correcte pour déterminer le statut sérologique de l'animal avant l'isolement de souches et la fiabilité limitée de la sérologie par MAT chez beaucoup d'espèces sauvages. Par ailleurs, un problème récurrent observé lors du protocole d'isolement, et inhérent à ce type de prélèvement est le taux de mortalité précoce particulièrement élevée des souris inoculées malgré le traitement de ces échantillons avec des doses élevées d'antibiotiques à large spectre (Chaichan, 2017). Ces mortalités s'expliquent par des infections liées à la multiplication de bactéries suite au début du processus de décomposition des carcasses prélevées. Au final, il apparaît que cette approche ne peut constituer qu'une stratégie d'échantillonnage secondaire et qu'elle est d'un intérêt limité par rapport à un échantillonnage planifié et optimisé.

Dans le cadre de notre thèse : Au cours de nos travaux au Sénégal, seulement deux souches ont pu être isolées sur un total de 22 animaux prélevés de manière opportuniste (voir Annexe 2).

V.1.1.4. L'échantillonnage d'animaux réalisé dans le cadre de chasses légales

De la même manière, plusieurs limites liées à l'échantillonnage d'animaux retrouvés morts en bord de route sont également relevées dans l'échantillonnage réalisé dans le cadre de chasses légales, une autre source potentielle de souches sauvages. En effet, même si la collecte des échantillons suite à la mise à mort des animaux garantit leur fraîcheur au moment des prélèvements, la conservation de la chaîne du froid lors de l'acheminement des prélèvements du terrain en direction du laboratoire où ils seront traités est souvent un aspect critique du protocole. Ces échantillons sont en effet le plus souvent obtenus dans des zones reculées et le conditionnement des échantillons jusqu'à leur arrivée au laboratoire n'est pas optimal dans la plupart des cas. Cela peut potentiellement affecter la viabilité des kystes dans les tissus, mais également favoriser la prolifération de bactéries potentiellement mortelles pour les souris inoculées. Concernant la sérologie, même si les échantillons de sérums obtenus sur une carcasse fraîche sont probablement d'une qualité meilleure que ceux obtenus sur une carcasse en début de décomposition, l'absence de données sur la fiabilité de la sérologie MAT chez la plupart des espèces sauvages limite, de toutes les manières, l'utilité de ce test

diagnostique en amont du protocole d'isolement. De plus, les chasses légales ne sont permises que durant des périodes bien définies de l'année et dépendent de la volonté des chasseurs à coopérer avec les chercheurs.

Dans le cadre de notre thèse : Au cours de nos travaux au Sénégal, seulement une souche a pu être isolée sur un total de 46 animaux récupérés au cours de chasses légales. Pour la plus grande partie des prélèvements, plus d'une semaine s'est écoulée avant l'étape de l'inoculation à la souris, ce qui a pu affecter la viabilité des parasites dans les tissus.

V.1.2. Approches méthodologiques : La conception du plan d'échantillonnage

Suite à la primo-infection d'un chat par une souche de *T. gondii*, des millions d'oocystes de cette souche sont disséminés dans l'environnement. Ils constituent, durant plusieurs mois, la principale source d'infection par *T. gondii* pour de nombreux hôtes intermédiaires qui évoluent dans cet environnement. Il n'est donc pas rare que les isolats collectés chez des hôtes intermédiaires qui partagent un environnement commun soit des clones d'une même souche (Verma et al., 2016). Au Sénégal, les souches identiques par génotypage microsatellites provenaient généralement de la même localité (quartier ou village). De ce fait, pour obtenir un échantillon de souches représentatif d'une région donnée, il est primordial de tendre vers une couverture maximale de la zone échantillonnée. En effet, un échantillonnage trop restreint d'un point de vue spatial au niveau de la région étudiée augmenterait artificiellement la clonalité observée dans la population considérée. Contrairement aux captures de rongeurs de la première étude de terrain, la stratégie d'échantillonnage appliquée au cours de la deuxième étude de terrain a été conçue pour l'isolement de souches de *T. gondii*. Au cours de cette étude, les 71 souches isolées provenaient de 32 localités différentes (quartier ou village), ce qui a abouti au final à une moyenne de 2,3 souches par localité. Parmi ces 66 souches génotypées en entier pour les 15 marqueurs, 53 génotypes uniques ont pu être caractérisés. En employant un protocole similaire sur un nombre comparable de souches isolées au Gabon (n=69), mais cette fois-ci originaires de 15 localités avec une moyenne de 4,6 souches par localité, 29 génotypes uniques ont pu être caractérisés (Mercier et al., 2010). Ces différences soulignent bien l'importance d'une conception réfléchie de l'échantillonnage en amont et les biais qui peuvent en découler. Ces biais potentiels doivent donc être pris en compte lors de la conduite d'analyses comparatives en lien avec la diversité génétique du parasite et incluant les résultats obtenus dans le cadre d'études différentes.

V.1.3. Approches méthodologiques : La caractérisation génétique des souches

Les souris de laboratoire les plus communes (Swiss, Balb/c, C57BL/6) sont très sensibles à l'infection par *T. gondii* et un passage par la souris est utile pour amplifier la charge parasitaire initiale contenu dans les prélèvements de terrain. Cette étape permet, dans la majorité des cas, d'obtenir chez la souris des charges parasitaires suffisantes pour le génotypage, que ce soit par le prélèvement du cerveau où des kystes se sont développés (souche avirulente) ou par ponction d'ascite qui contient des tachyzoïtes (souche virulente). Cependant, l'isolement de souches sur souris pose certaines contraintes logistiques, et le génotypage direct à partir des prélèvements de terrain peut parfois être la seule alternative. Dans cette partie, nous discutons des biais inhérents à chacune des deux approches, que nous illustrons avec des exemples concrets.

V.1.3.1. Le génotypage direct à partir de prélèvements de terrain

Dans la première étude de terrain, qui s'est basée sur le génotypage direct à partir du cerveau des petits mammifères capturés, une influence du facteur « souche » sur la charge tissulaire de parasites — et donc sur le succès du génotypage — peut avoir induit un biais non négligeable dans les différences de souches de *T. gondii* observées entre espèces. En d'autres termes, nous pouvons supposer que certaines souches ou

lignées ont une capacité à former un plus grand nombre de kystes chez leurs hôtes et sont donc plus à même d'être caractérisées lors du génotypage. L'influence du facteur souche sur la charge tissulaire de parasites n'a pas été évaluée pour le rat noir *R. rattus* (aucune souche génotypée) et pour la crocidure *C. olivieri* (une souche génotypée). En revanche, la diversité génotypique notable relevée chez le rat géant *C. gambianus* (4 lignées pour 5 génotypes) semble écarter une influence du facteur « souche » sur la charge tissulaire de parasites, qui s'expliquerait donc plutôt par des facteurs liés à l'hôte. Chez la souris *M. m. domesticus*, les 6 souches génotypées correspondaient à des souches des lignées de *type II* (n=4) et *type III* (n=2). Concernant les souris infectées pour lesquelles la souche infectante n'a pas pu être génotypée, l'hypothèse d'infections par des lignées conduisant potentiellement à des charges tissulaires plus faibles de parasites ne peut être écartée. En plus du facteur « souche parasitaire », d'autres, tels que l'espèce hôte, l'âge de l'infection, la période écoulée depuis la primo-infection, la charge infectieuse, le stade parasitaire responsable de l'infection (oocyste, bradyzoïte ou tachyzoïte) et les interactions immunitaires avec d'autres agents infectieux pourraient expliquer la variabilité dans les charges tissulaires observées d'un individu à l'autre.

Par ailleurs, des études expérimentales réalisées sur des souris de laboratoire (Elbez-Rubinstein et al., 2009; Jensen et al., 2015) ont montré que les souches habituellement létales pour ce type d'hôtes dans le cas d'une primo-infection pouvaient causer une surinfection chronique de souris préalablement infectées par une souche avirulente de *T. gondii* (*type II* ou *type III*). Ces souches réinfectantes montrent, contrairement aux souches avirulentes de *type II* et de *type III*, la capacité à échapper à l'action du système immunitaire de l'hôte et à former de nouveaux kystes chez cet hôte déjà infecté. En revanche, le nombre de kystes formés par la souche réinfectante semble bien inférieur à celui formés par la souche responsable de la primo-infection, comme démontré par utilisation d'une souche transfectée avec le gène de la bêta-galactosidase (Elbez-Rubinstein et al., 2009). Dans notre cas, l'hypothèse qui se profile au vu de ces résultats expérimentaux est que les souches de la lignée *Africa 1* peuvent causer une réinfection chronique chez les souris *M. m. domesticus* déjà infectées par des types II ou III dans les régions où ces trois lignées sont présentes, comme à Dakar. Un génotypage direct réalisé sur des souris co-infectées détecterait plus vraisemblablement la souche responsable de la primo-infection l'origine d'une charge tissulaire de kystes plus importante dans la plupart des cas. Néanmoins, la prédominance des lignées de *type II* et *type III* à Dakar chez les volailles, en accord avec la diversité de souches génotypées chez les souris *M. m. domesticus*, semble relativiser ces hypothèses.

V.1.3.2. Le génotypage après isolement de la souche par inoculation à la souris de laboratoire

La deuxième étude de terrain a été basée sur l'isolement de souches sur souris de laboratoire, principalement à partir du cœur et du cerveau d'animaux domestiques ayant un test sérologique positif pour *T. gondii*. Au cours de ce protocole, le cœur et le cerveau de ces animaux ont été broyés mécaniquement à l'aide d'un blender, puis digérés à 37°C pendant 90 minutes dans un bain-marie à agitation, au contact d'une solution contenant de la trypsine porcine. Le digestat obtenu a été filtré, puis soumis à trois cycles de centrifugation/lavage. Au final un culot de quelques millilitres (en général de 2 à 5 ml) où se concentrent les bradyzoïtes libérés de leur paroi kystique a été récupéré. Le culot ainsi obtenu et traité aux antibiotiques a été inoculé à trois souris de laboratoire par échantillon animal.

Si le passage par la souris permet un meilleur rendement que le génotypage direct, un certain nombre de contraintes et de possibles biais inhérents à cette méthode peut être relevé. Tout d'abord, elle nécessite la disponibilité d'une animalerie souris et d'un suivi régulier des individus inoculés, un prérequis parfois complexe à mettre en place dans les pays du Sud. De plus, l'aval d'un comité d'éthique est nécessaire à l'entame du protocole. Enfin, la viabilité des kystes contenus dans les prélèvements destinés à l'isolement de souches est une condition primordiale à la réussite de ce protocole. Cela impose de travailler sur des échantillons de tissus frais et conservés dans de bonnes conditions (à 4°C pendant une semaine maximum).

En outre, la digestion enzymatique des organes, par des enzymes tels que la trypsine ou la pepsine, diminue la proportion de bradyzoïtes viables durant le protocole (Dubey, 2009). Une charge parasitaire initiale trop faible dans l'échantillon de tissu traité pourrait donc conduire, au terme de la digestion, à un nombre de bradyzoïtes viables insuffisant pour infecter les souris inoculées. Surtout, une étude expérimentale a montré une susceptibilité variable des bradyzoïtes à la digestion par la pepsine en fonction de la souche parasitaire (Fux et al., 2007). Ses résultats suggèrent une plus grande résistance à la pepsine des bradyzoïtes des souches ME49 (*type II*) et CTG (*type III*) par rapport aux bradyzoïtes de la souche FOU (*Africa 1*). Ces observations laissent à penser qu'il peut se produire un biais dans les résultats, conduisant à un succès variable de l'isolement en fonction de la souche ou de la lignée inoculée à la souris. Aucune donnée n'est en revanche disponible quant à la résistance des bradyzoïtes de différentes souches à la trypsine, qui, comme mentionné plus haut, est l'enzyme que nous avons employée dans notre protocole. Au Sénégal, sept souches pour lesquelles l'isolement sur souris a échoué ont pu être tout de même génotypées à partir du culot de digestion des organes de volailles. Elles appartenaient aux lignées de *type II* (n=1), *type III* (n=1), *Africa 1* (n=2) et *Africa 4* (n=3). Un biais lié à la lignée du parasite lors de l'isolement ne semble pas avoir été retrouvé lors des résultats obtenus sur ce petit échantillon. Comme la majorité des souches pour lesquelles l'isolement sur souris a échoué n'ont pas pu être génotypées, cette question mérite donc d'être approfondie par des études expérimentales sur un plus grand nombre de souches pour chaque lignée. Un autre biais pourrait survenir dans le cas d'un isolement de souches réalisé à partir des tissus d'un animal présentant une infection mixte. Le passage par la souris pourrait en effet sélectionner une des deux souches, qui se multiplierait plus que l'autre. Egalement, si une des deux souches est virulente pour la souris, elle pourrait induire une infection généralisée mortelle avant que l'autre n'ait pu se multiplier suffisamment pour être génotypable. Dans le cas de notre étude, ce phénomène aurait pu conduire à une sous-estimation des infections par des souches non-virulentes, comme celles appartenant aux lignées de *type II*, *type III* et *Africa 4*, si les animaux porteurs avaient été également coinfectés par des souches virulentes, comme les souches de la lignée *Africa 1*.

V.1.4. Approches méthodologiques : conclusion et perspectives

La discussion développée dans cette partie a permis de souligner les nombreuses difficultés rencontrées lors des différentes étapes du protocole d'isolement de souches en vue de leur génotypage. La prévalence, l'accessibilité aux prélèvements de tissus et le rendement de l'isolement sur souris de laboratoire sont autant de facteurs qui ne permettent pas de prédire à l'avance nombre de souches isolées lors de la conception du plan d'échantillonnage. Le développement de techniques de génotypage plus sensibles, permettant de génotyper les souches directement à partir des prélèvements de tissus, constitueraient une avancée majeure dans le domaine de l'étude de la diversité génétique de *T. gondii*. Ces dernières années, des avancées importantes ont été réalisées dans le domaine de la génomique notamment en termes de coût et d'optimisation de la sensibilité des techniques employées. Notamment, des techniques d'enrichissement de l'ADN parasitaire par rapport à l'ADN de l'hôte (Thoendel et al., 2016; Cowell et al., 2017) ont permis l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons auparavant non exploitables par analyse génomique. Ces progrès ouvrent des perspectives intéressantes pour l'étude de la diversité génétique de *T. gondii*. Le sérotypage, qui dispenserait de la nécessité de travailler sur des échantillons de tissus, pourrait grandement faciliter l'échantillonnage en vue de l'étude de la diversité du parasite. Cependant, cette approche permet actuellement uniquement de distinguer les infections par les souches de type II de celles causées par des souches d'autres lignées (Kong et al., 2003). Les progrès dans ce domaine demeurent également lents et il est improbable que cette technique permette d'atteindre un pouvoir discriminant comparable à celui des méthodes génétiques (Dard et al., 2016).

V.2. Déterminants de la structure spatiale des populations de *Toxoplasma gondii* : avancées et perspectives

La structure actuelle des populations de *T. gondii* à travers le monde témoigne d'une émergence récente de la plupart des lignées actuelles du parasite à partir d'un petit nombre de lignées ancestrales (Minot et al., 2012), vraisemblablement au moment de l'apparition de la domestication et de l'agriculture (Su et al., 2003). Les modifications bio-environnementales profondes qui ont accompagné cette période ont eu une influence majeure sur l'évolution de nombreux parasites (Rosenthal, 2009). Concernant *T. gondii*, ces modifications ont agi comme un goulot d'étranglement pour les populations de ce parasite (Sibley and Ajioka, 2008). Toutes les lignées domestiques décrites à ce jour partagent en effet un fond génétique commun (Khan et al., 2007) que l'on ne retrouve pas chez les souches sauvages et qui a été associé à la capacité de ces souches à être transmises par le chat domestique (Khan et al., 2014). La distribution spatiale de ces lignées atteste d'une grande capacité des souches du parasite à migrer sur de longues distances. Malgré cela, la structure spatiale des populations de *T. gondii* à travers le monde montre un contraste géographique fort (Shwab et al., 2014). Les forces évolutives qui concourent au maintien de cette structure demeurent largement méconnues. Cette structure pourrait résulter (a) des pressions de sélection variables qui pourraient s'exercer sur les lignées du parasite d'une région à l'autre, (b) de la diversité des voies migratoires potentielles, (c) de la variabilité spatio-temporelle observée dans l'intensité des échanges humains potentiellement vecteurs de ces migrations, mais également (d) de la dimension aléatoire qui caractérise les migrations. L'imbrication probable de tous ces facteurs dans le façonnement de la structure spatiale des populations de *T. gondii* rend l'étude de cette question particulièrement complexe.

V.2.1. Voies migratoires et structure des populations

Lehmann et collaborateurs (2006) avaient émis l'hypothèse que le commerce maritime colonial pouvait avoir eu une influence importante sur la structure des populations de *T. gondii* à travers le monde. Une des hypothèses formulées par ces auteurs était que la structure des populations du parasite à proximité des ports actifs au début de la période du commerce transatlantique devrait être très différente de celle des régions éloignées.

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence une prédominance des lignées archétypales de type II et de type III au niveau des régions portuaires du Sénégal, en comparaison de l'intérieur des terres où la lignée africaine Africa 1 est la lignée la plus prévalente. La comparaison des génotypes microsatellites de type II du Sénégal avec d'autres génotypes de type II d'Europe de l'Ouest et d'Afrique suggère que les souches de type II du Sénégal sont plus proches des européennes que des africaines. En accord avec les prédictions de Lehmann et collaborateurs (2006), les résultats de notre étude confortent l'hypothèse d'un rôle du commerce maritime dans la dissémination des souches de *T. gondii*, probablement via les rongeurs involontairement transportés dans les navires d'un port à l'autre. Ces résultats confirment ainsi l'intérêt de l'emploi des marqueurs microsatellites pour répondre à des questions relatives à l'histoire évolutive récente des organismes vivants.

En revanche, plusieurs limites peuvent être soulignées. Au cours de nos analyses, la comparaison entre les souches du Sénégal et les celles d'Europe de l'Ouest et d'Afrique s'est limitée aux souches de la lignée type II. Les faibles effectifs disponibles pour les autres lignées au niveau des régions considérées n'ont pas permis d'entreprendre ce type d'analyses comparatives. Nous avons pu relever une diversité allélique relativement importante dans les souches de la lignée type II, ce qui aurait pu limiter, dans une certaine mesure, la netteté du signal observé dans la différenciation des populations géographiques de cette lignée. Cela pourrait s'expliquer également par une possible sous-estimation de la complexité des échanges entre populations géographiques, ou par un rôle de l'homoplasie. L'augmentation du nombre de marqueurs

microsatellites analysés pourrait apporter une plus grande résolution dans nos analyses. Également, des analyses génétiques de souches combinant des marqueurs microsatellites et autres (mitochondriaux par exemple) pourraient contribuer à consolider les tendances observées. Les génotypes du Sénégal n'ont pu être comparés qu'à ceux issus de populations africaines éloignées géographiquement (Égypte, Éthiopie et Afrique du Sud). Une comparaison avec des pays plus proches, tels que la Mauritanie ou le Mali, aurait été plus informative concernant une hypothétique introduction des souches de *T. gondii* au Sénégal par voie terrestre. Les échanges avec ces deux pays en particulier pourraient avoir une importance non négligeable dans l'introduction de souches de *T. gondii* au niveau des principaux pôles urbains du Sénégal. En effet, dans les grandes villes du Sénégal (en particulier à Dakar), plusieurs centaines de milliers de moutons en provenance du Mali et de Mauritanie sont sacrifiés dans les maisons durant certaines fêtes traditionnelles (Niang and Mbaye, 2013). L'abattage et la découpe des carcasses sont habituellement réalisés au niveau des cours des maisons (Niang and Mbaye, 2013), ce qui facilite l'exposition des chats locaux (observation personnelle) à des morceaux de viandes potentiellement contaminés par des kystes de *T. gondii* originaire des pays limitrophes. De la même manière, la disponibilité de collection de souches isolées au niveau des principaux anciens ports négriers (Nantes, La Rochelle et Bordeaux) aurait potentiellement permis d'obtenir des résultats plus précis sur le rôle du commerce maritime colonial dans la dissémination transcontinentale de souches de *T. gondii*. En parallèle, des estimations du taux de mutation des régions microsatellites du génome de *T. gondii* seront utiles afin d'estimer la vitesse de dissémination des souches du parasite et de tenter d'associer la structure actuelle des populations à des événements historiques précis, tels que le commerce triangulaire ou le commerce transsaharien par exemple. Si, aujourd'hui, les populations de souches de type II du Sénégal se distinguent clairement de celles d'Égypte et d'Éthiopie, il se peut que cela n'ait pas été le cas durant la période historique où des échanges entre les deux populations géographiques de cette lignée ont pu avoir lieu. La fréquence et la vitesse à laquelle les souches de *T. gondii* se renouvellent dans une région donnée, du fait des migrations de souches, demeurent en effet méconnues. Dans ce contexte, des études de terrain basées sur un échantillonnage de localités identiques mais répété dans le temps pourraient permettre d'appréhender pour la première fois la dynamique temporelle des populations de *T. gondii*.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés de façon secondaire à un possible rôle des oiseaux migrateurs dans la dissémination de souches de *T. gondii*. Notre travail de terrain au niveau de la zone de Saint-Louis où se situe le parc du Djoudj (parc naturel rassemblant chaque année près de trois millions d'oiseaux migrateurs) a été pour nous l'opportunité d'avoir accès à des échantillons de Sarcelles d'été (*Spatula querquedula*). Ces canards sauvages migrent entre l'Europe et l'Afrique. Ils pourraient, de ce fait, être les vecteurs d'une propagation transcontinentale de souches du parasite. Même si la sérologie a révélé la présence d'une possible infection chez huit individus, aucune souche n'a pu être isolée.

Un financement ANR (ANR IntroTox) obtenu par notre équipe en 2017, à la rédaction duquel j'ai contribué, aura notamment pour objectif l'exploration du rôle des migrations d'oiseaux dans la dissémination de souches de *T. gondii*. Dans ce cadre, nous avons entamé des isolements de souches à partir d'échantillons de canards migrateurs en Camargue (France), une zone qui partage d'importants couloirs migratoires avec l'Afrique.

V.2.2. Pressions de sélection et structure des populations

Au cours de cette thèse, nous avons montré la présence quasi-exclusive de lignées avirulentes pour la souris de laboratoire (*type II*, *type III* et *Africa 4*) dans les régions du Nord et de l'Est de l'Afrique. À l'opposé, une prévalence élevée de souches appartenant à des lignées virulentes pour la souris de laboratoire (principalement *Africa 1*) a pu être relevée en Afrique tropicale (Ouest et centrale). Notre hypothèse d'un rôle de la souris *M. m. domesticus* pour expliquer cette structure s'appuie sur la présence ancienne de cette

espèce en Afrique du Nord et de l'Est (Bonhomme et al., 2011) où elle est présente en abondance. En revanche, cette espèce commensale a été introduite plus récemment en Afrique tropicale, probablement via le commerce colonial européen et n'a que partiellement supplanté les espèces natives de rongeurs commensaux. Même si la virulence observée chez les lignées de souris de laboratoire ne peut être directement extrapolée aux populations naturelles de souris, la structure spatiale des populations de *T. gondii* en Afrique interroge sur un rôle possible de la souris dans la contre-sélection de la lignée *Africa 1* dans son aire de distribution. Au Sénégal, cette hypothèse est également appuyée — cette fois-ci à plus fine échelle géographique — par la rareté des souches de la lignée *Africa 1* au niveau des zones où la souris *M. m. domesticus* est l'espèce commensale prédominante. Dans l'une de ces zones (la ville de Dakar) où la diversité des souches chez les petits mammifères commensaux a été explorée, cette lignée n'a pu être identifiée que chez les espèces africaines natives. Pour la première fois, des résultats issus d'études de terrain soutiennent l'hypothèse de coadaptations spécifiques entre les lignées domestiques du parasite et leurs principaux hôtes réservoirs. Ces résultats apportent de nouveaux éléments dans la compréhension des déterminants de la structure spatiale des populations de *T. gondii*. Cependant, il est important de noter que cette hypothèse se base sur des effectifs de souches relativement faibles et d'autres études seront nécessaires pour confirmer les résultats obtenus par ces travaux pionniers. Dans l'élaboration d'études futures, il faudra prendre en compte la difficulté à atteindre des effectifs de souches suffisants pour tenter de mettre en évidence une potentielle variabilité interspécifique dans la diversité génétique de *T. gondii* en fonction de l'espèce hôte. Si la distribution géographique des différentes espèces de rongeurs commensaux est relativement bien documentée à travers le monde, très peu de données existent concernant les abondances relatives d'individus par espèce dans chaque région. Ce dernier aspect est fondamental, car il est probable que ce sont les espèces les plus abondantes dans une région donnée qui exercent la plus forte pression de sélection sur les souches locales de *T. gondii*. Au Sénégal, où des données précises sur les abondances relatives des différentes espèces de rongeurs commensaux sont disponibles (Dalecky et al., 2015), il serait également intéressant d'élargir l'échantillonnage à d'autres zones du pays. Cela permettrait de confirmer cette dichotomie dans la structure des populations de *T. gondii* entre les zones colonisées et les zones non encore colonisées par la souris. Il est à noter, cependant, que les zones où la souris *M. m. domesticus* n'est pas présente sont de plus en plus rares dans le nord du pays, où le développement rapide du réseau routier accélère la propagation de ce rongeur invasif, au détriment des espèces natives. Dans ce sens, le front d'invasion de la souris au nord-est du Sénégal pourrait constituer un cadre particulièrement intéressant pour l'exploration du rôle des hôtes de *T. gondii* dans l'évolution de la structure des populations du parasite. L'élaboration d'études, où la diversité des souches qui circulent au niveau de (a) villages non colonisés, (b) de villages en cours d'invasion et (c) de villages récemment colonisés serait comparée, pourrait permettre d'appréhender de manière précise l'évolution spatiotemporelle des populations du parasite en lien avec ces processus. Au Sud du pays (à l'exception de Kédougou), c'est plutôt le rat noir *R. rattus* qui semble avoir pris l'ascendant sur les espèces natives de rongeur commensaux (Dalecky et al., 2015). Cette espèce pourrait exercer une pression de sélection différente sur les populations de *T. gondii* comparée à la souris. Aucune donnée expérimentale n'existe concernant sa susceptibilité aux différentes souches de *T. gondii*. L'étude de la diversité génétique du parasite au niveau des régions où cette espèce est devenue prédominante pourrait apporter des données intéressantes quant à son influence possible sur la structure des populations de *T. gondii*.

La réalisation d'infections expérimentales sur souris sauvages ou sur d'autres espèces de rongeurs prélevées dans la nature serait également un moyen de tester leur résistance aux différentes lignées de *T. gondii*. Cela permettrait de formuler des prédictions sur les interactions hôtes/parasites qui pourraient se produire en conditions naturelles. En revanche, il est important de prendre en compte que les gènes impliqués dans la résistance à *T. gondii* montrent un degré de polymorphisme très élevé parmi les populations de souris naturelles (Lilue et al., 2013). Cette donnée souligne la nécessité de conduire ce type d'études expérimentales sur des individus issus de plusieurs populations de souris sauvages à travers le

monde. L'élaboration d'une telle étude semble très difficile d'un point de vue logistique mais constitue à nos yeux un des seuls moyens d'obtenir des résultats généralisables aux différentes populations sauvages de la souris. Ce type d'études permettrait potentiellement de mettre en évidence des associations entre certains allèles de la souris et la résistance (ou la susceptibilité) aux différentes souches de *T. gondii*. Cette approche serait utile afin de développer des marqueurs génétiques prédictifs de la résistance ou de la susceptibilité au parasite chez ces hôtes.

V.3. Implications en santé humaine

V.3.1. Diversité génétique en Afrique

Des données cliniques, quoique limitées, ont pu être obtenues pour des cas de toxoplasmose humaine chez des patients originaires d'Afrique dans le cadre d'études précédentes (CNR Toxoplasmose, 2007; Ajzenberg et al., 2009). Dans un certain nombre de cas, la souche infectante a pu être génotypée. Cela a permis la confrontation des données cliniques aux données génotypiques afin d'évaluer la pathogénicité de ces souches. Cependant, la très grande majorité des souches génotypées provenaient de patients immunodéprimés (HIV ou sous traitement immunosuppresseur). Leur immunodépression a vraisemblablement permis la réactivation d'une infection chronique ancienne, ce qui a conduit à l'apparition de signes cliniques liées à la toxoplasmose. Parmi les souches responsables de ces infections, des souches appartenant aux lignées type II, type III, Africa 1 et Africa 4 ont pu être identifiées. Cela suggère que les souches de ces lignées seraient faiblement pathogéniques pour l'individu immunocompétent. Nos résultats montrent (cf Chapitre II) que ces quatre lignées sont probablement les plus prévalentes en Afrique dans le milieu domestique.

En revanche, peu d'études ont été conduites concernant la prévalence de la toxoplasmose oculaire en Afrique. Dans une étude réalisée en Grande-Bretagne, l'incidence de cette forme de la maladie était 100 fois plus élevée chez les immigrants nés en Afrique de l'Ouest que chez les personnes nées en Grande-Bretagne et non issues de l'immigration (Gilbert et al., 1999). Les souches responsables de ce taux d'incidence inhabituellement élevé n'ont pas pu être isolées pour pouvoir envisager un génotypage. Néanmoins, la prédominance de la lignée Africa 1 en Afrique de l'Ouest d'après nos résultats (cf Chapitre II) interroge sur un possible rôle de cette lignée dans l'incidence de ces cas de toxoplasmose oculaire. Une étude en population générale dans la région du centre au Ghana (Abu et al., 2016) rapporte une prévalence de la toxoplasmose oculaire de 2,6 % (3% parmi les séropositifs). Ce niveau apparaît plus élevé que la prévalence en Amérique du Nord, qui se situe autour de 0,6% d'après une étude conduite en population générale dans une petite ville du Maryland, USA, au début des années 70 (Smith and Ganley, 1972) et moins de 0,7% au Canada sur le même type de populations (Burnett et al., 1998). Il est probable que la prévalence de la toxoplasmose oculaire aux États-Unis soit encore plus faible de nos jours puisque celle de la toxoplasmose en population générale a considérablement chuté depuis les années 70 (Peyron et al., 2017). Cependant, plus grand un nombre d'études en Afrique est nécessaire pour conclure sur la prévalence de cette forme de la maladie dans ce continent, du fait des disparités importantes qui peuvent être observées d'une région à l'autre dans d'autres régions du monde comme au Brésil où la prévalence de la toxoplasmose oculaire varie de 1,2% au nord (ville de Natal) (de Amorim Garcia et al., 2004) à 17,7% au sud (ville de Erechim) (Glasner et al., 1992). Enfin, les souches qui circulent dans le milieu sauvage en Afrique demeurent largement méconnues. En Amérique du Sud, ce sont bien celles issues du milieu sauvages qui sont à l'origine des formes les plus sévères de la toxoplasmose (Carme et al., 2002). En Afrique, si des formes systémiques sévères de la toxoplasmose chez l'immunocompétent n'ont été rapportées que dans de très rares cas, cela pourrait être due à un manque de sensibilisation des praticiens à ces formes de la maladie ou à un diagnostic erroné avec

d'autres maladies infectieuses plus fréquentes, comme le paludisme par exemple, en se basant uniquement sur des critères cliniques (Crump et al., 2013; Stoler et al., 2014; WHO, 2016). En Amérique du Sud, et plus particulièrement en Guyane, la forme disséminée de la toxoplasmose ou toxoplasmose amazonienne est plus souvent diagnostiquée depuis que les praticiens en charge de ce type de cas ont été sensibilisés à cette maladie.

V.3.2. Voies de migration

Des études antérieures avaient montré un rôle du commerce via l'importation de viandes dans l'incidence de formes sévères de toxoplasmose en France (Elbez-Rubinstein et al., 2009; Pomares et al., 2011). Nos résultats soutiennent un rôle du commerce maritime dans l'introduction de souches de *T. gondii* via le transport involontaire de rongeurs au Sénégal depuis l'Europe. Les souches européennes de *T. gondii* étant peu pathogènes pour l'homme, il est peu probable que leur introduction ait des implications de santé publique. En revanche, des migrations de souches via les rongeurs dans d'autres contextes, comme, par exemple, d'Amérique du Sud vers l'Europe, pourraient théoriquement être à l'origine de dissémination de souches potentiellement pathogènes. Au vu de nos résultats, il est peu probable que la souris domestique soit à l'origine de la dissémination de souches pathogènes pour l'homme, du fait de sa susceptibilité à la plupart des souches atypiques de *T. gondii*. L'hypothèse d'un rôle des espèces du genre *Rattus* dans la dissémination de souches pathogènes pour l'homme paraît plus raisonnable du fait de la grande résistance du rat (du moins le rat brun *Rattus norvegicus*) à la toxoplasmose clinique. Le rat brun *R. norvegicus* et le rat noir *R. rattus* ont été introduits en Amérique du Sud par les colons européens (Aplin et al., 2011; Puckett et al., 2016). A partir de cette période, les flux maritimes qui relient l'Amérique du Sud à l'Europe auraient pu permettre de multiples échanges entre les populations européennes et sud-américaines de rats établies au niveau de ports de ces deux continents. Un échantillonnage ciblé sur les zones portuaires européennes liées au commerce colonial pourrait permettre de tester ces hypothèses. Cette question de recherche sera explorée dans le cadre de l'ANR IntroTox, un projet porté par notre équipe depuis 2017. Au cours de ce projet, un échantillonnage, notamment au niveau des régions de Nantes, Bordeaux et La Rochelle (historiquement les principaux ports négriers de France) est envisagé pour l'isolement de souches de *T. gondii*.

V.3.3. Hybridations et introgressions génomiques

La diversité de *T. gondii* est très largement clonale en Afrique. Les seules souches dites « atypiques » présentent le plus souvent une composition allélique compatible avec des recombinaisons entre la lignée type III et la lignée Africa 1, peut-être du fait d'une origine commune qui lie ces souches à ces deux lignées très présentes en Afrique. Cependant, ces observations se basent uniquement sur l'analyse d'allèles microsatellites. Il est possible que l'analyse du génome complet de ces souches révèle une complexité plus grande dans la structure des populations de *T. gondii*. Un des objectifs de l'ANR Introtox sera la recherche d'introgressions génomiques dans les lignées de *T. gondii* d'Afrique, mais surtout de France. Cela permettra de savoir si une souche d'une lignée donnée pourrait contenir dans ses chromosomes des régions génomiques issues d'autres lignées, suite à des phénomènes d'hybridation entre souches que l'analyse de marqueurs microsatellites ne peut démontrer. L'intérêt épidémiologique de ces analyses sera d'explorer la possibilité d'introgression de souches pathogènes importées dans les populations locales de *T. gondii*. Bien que les hybridations entre souches de *T. gondii* soient probablement rares, elles pourraient conduire à l'évolution et à la propagation de traits épidémiologiques importants, y compris ceux liés à la virulence et à la dynamique de transmission (Grigg et al., 2001; Khan et al., 2009). Dans la région de Saint-Louis au Sénégal,

nous avons isolé une souche de type II virulente pour les souris de laboratoire. L'analyse du génome de cette souche pourrait permettre d'expliquer la virulence observée et mettre en évidence de potentielles introgressions de gènes de virulence dans le génome de cette souche liées à une hybridation avec une souche africaine virulente.

Références bibliographiques

- Abu, E.K., Boampong, J.N., Amoabeng, J.K., Ilechie, A.A., Kyei, S., Owusu-Ansah, A., Boadi-Kusi, S.B., Amoani, B., Ayi, I., 2016. Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis in Three Community Surveys in the Central Region of Ghana, West Africa. *Ophthalmic Epidemiol* 23, 14–19. <https://doi.org/10.3109/09286586.2015.1089579>
- Afonso, E., Poulle, M.-L., Lemoine, M., Villena, I., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., 2007. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in small mammals from the Ardennes region, France. *Folia Parasitol.* 54, 313–314.
- Afonso, E., Thulliez, P., Pontier, D., Gilot-Fromont, E., 2007. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitology* 134, 1963–1971. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003320>
- Ahmed, N., French, T., Rausch, S., Kühl, A., Hemminger, K., Dunay, I.R., Steinfelder, S., Hartmann, S., 2017. *Toxoplasma* Co-infection Prevents Th2 Differentiation and Leads to a Helminth-Specific Th1 Response. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 341. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00341>
- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L., 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34, 1185–1196. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.007>
- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Tibayrenc, M., Dardé, M.L., 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32, 27–38.
- Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.-L., 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4641–4645. <https://doi.org/10.1128/JCM.01152-10>
- Ajzenberg, D., Lamaury, I., Demar, M., Vautrin, C., Cabié, A., Simon, S., Nicolas, M., Desbois-Nogard, N., Boukhari, R., Riahi, H., Dardé, M.-L., Massip, P., Dupon, M., Preux, P.-M., Labrunie, A., Boncoeur, M.-P., 2016. Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii*: A Prospective and Multicentric Study. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004790. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004790>
- Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J., Aubert, D., Franck, J., Bessières, M.-H., Quinio, D., 2009. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *The Journal of infectious diseases* 199, 1155–1167.
- Aplin, K.P., Suzuki, H., Chinen, A.A., Chesser, R.T., Have, J. ten, Donnellan, S.C., Austin, J., Frost, A., Gonzalez, J.P., Herbreteau, V., Catzeflis, F., Soubrier, J., Fang, Y.-P., Robins, J., Matisoo-Smith, E., Bastos, A.D.S., Maryanto, I., Sinaga, M.H., Denys, C., Bussche, R.A.V.D., Conroy, C., Rowe, K., Cooper, A., 2011. Multiple Geographic Origins of Commensalism and Complex Dispersal History of Black Rats. *PLOS ONE* 6, e26357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026357>
- Araújo, J.B., da Silva, A.V., Rosa, R.C., Mattei, R.J., da Silva, R.C., Richini-Pereira, V.B., Langoni, H., 2010. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. *Veterinary parasitology* 174, 328–331.
- Asgari, Q., Keshavarz Valian, H., Rezaeian, M., Shojaee, S., Mehrabani, D., 2015. *Toxoplasma gondii*: sexual transmission in mice. *J Parasit Dis* 39, 253–257. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0330-5>
- Bajnok, J., Boyce, K., Rogan, M.T., Craig, P.S., Lun, Z.R., Hide, G., 2015. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in localized populations of *Apodemus sylvaticus* is linked to population genotype not to population location. *Parasitology* 142, 680–690. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001760>
- Berdoy, M., Webster, J.P., Macdonald, D.W., 2000. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc. Biol. Sci.* 267, 1591–1594. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1182>

- Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., Mercier, A., Devillard, S., Ajzenberg, D., 2017. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infect. Genet. Evol.* 48, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.020>
- Beverley, J.K.A., 1959. Congenital Transmission of Toxoplasmosis through Successive Generations of Mice. *Nature* 183, 1348. <https://doi.org/10.1038/1831348a0>
- Blaizot, R., Nabet, C., Blanchet, D., Martin, E., Mercier, A., Dardé, M.-L., Elenga, N., Demar, M., 2018. Pediatric Amazonian Toxoplasmosis Caused by Atypical Strains in French Guiana, 2002-2017. *Pediatr. Infect. Dis. J.* <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002130>
- Bonhomme, F., Orth, A., Cucchi, T., Rajabi-Maham, H., Catalan, J., Boursot, P., Auffray, J.-C., Britton-Davidian, J., 2011. Genetic differentiation of the house mouse around the Mediterranean basin: matrilineal footprints of early and late colonization. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 278, 1034–1043. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1228>
- Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., Boothroyd, J.C., 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27, 1787–1792.
- Burnett, A.J., Shortt, S.G., Isaac-Renton, J., King, A., Werker, D., Bowie, W.R., 1998. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* 105, 1032–1037. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(98\)96004-3](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(98)96004-3)
- 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., 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4037–4044.
- Casartelli-Alves, L., Boechat, V.C., Macedo-Couto, R., Ferreira, L.C., Nicolau, J.L., Neves, L.B., Millar, P.R., Vicente, R.T., Oliveira, R.V.C., Muniz, A.G., Bonna, I.C.F., Amendoeira, M.R.R., Silva, R.C., Langoni, H., Schubach, T.M.P., Menezes, R.C., 2014. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. *Vet. Parasitol.* 204, 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.039>
- Chaichan, P., 2017. Epidemiology of *Toxoplasma gondii* in Thailand. *Limoges*.
- Chaichan, P., Mercier, A., Galal, L., Mahittikorn, A., Arie, F., Morand, S., Boumédiène, F., Udonsom, R., Hamidovic, A., Murat, J.B., Sukthana, Y., Dardé, M.L., 2017. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infect. Genet. Evol.* 53, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.002>
- CNR Toxoplasmose, 2007. Rapport d'activités.
- Cowell, A.N., Loy, D.E., Sundararaman, S.A., Valdivia, H., Fisch, K., Lescano, A.G., Baldeviano, G.C., Durand, S., Gerbasi, V., Sutherland, C.J., Nolder, D., Vinetz, J.M., Hahn, B.H., Winzeler, E.A., 2017. Selective Whole-Genome Amplification Is a Robust Method That Enables Scalable Whole-Genome Sequencing of *Plasmodium vivax* from Unprocessed Clinical Samples. *MBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.02257-16>
- Cresti, S., Ciacci, C., Donati, E., Giordano, I., Tordini, G., Barberi, A., 2001. Evaluation of PCR methods for 5S-rDNA and p30 genes to detect *Toxoplasma gondii* in blood and other clinical samples. *New Microbiol.* 24, 171–174.
- Cristina, N., Liaud, M.F., Santoro, F., Oury, B., Ambroise-Thomas, P., 1991a. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. *Exp. Parasitol.* 73, 73–81.
- Cristina, N., Oury, B., Ambroise-Thomas, P., Santoro, F., 1991b. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol. Res.* 77, 266–268.
- Crump, J.A., Morrissey, A.B., Nicholson, W.L., Massung, R.F., Stoddard, R.A., Galloway, R.L., Ooi, E.E., Maro, V.P., Saganda, W., Kinabo, G.D., Muiruri, C., Bartlett, J.A., 2013. Etiology of Severe Non-malaria Febrile Illness in Northern Tanzania: A Prospective Cohort Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2324. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002324>

- Dabritz, H.A., Miller, M.A., Gardner, I.A., Packham, A.E., Atwill, E.R., Conrad, P.A., 2008. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in wild rodents from central coastal California and a review of *T. gondii* prevalence in rodents. *J. Parasitol.* 94, 675–683. <https://doi.org/10.1645/GE-1342.1>
- Dalecky, A., Bâ, K., Piry, S., Lippens, C., Diagne, C.A., Kane, M., Sow, A., Diallo, M., Niang, Y., Konečný, A., Sarr, N., Artige, E., Charbonnel, N., Granjon, L., Duplantier, J.-M., Brouat, C., 2015. Range expansion of the invasive house mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: a synthesis of trapping data over three decades, 1983–2014. *Mammal Review* 45, 176–190. <https://doi.org/10.1111/mam.12043>
- Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P., Pelloux, H., 2016. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends Parasitol.* 32, 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>
- Dardé, M.L., 2008. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite* 15, 366–371. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153366>
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78, 786–794.
- Darde, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1988. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 551–558.
- Dass, S.A.H., Vasudevan, A., Dutta, D., Soh, L.J.T., Sapolsky, R.M., Vyas, A., 2011. Protozoan parasite *Toxoplasma gondii* manipulates mate choice in rats by enhancing attractiveness of males. *PLoS ONE* 6, e27229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027229>
- de Amorim Garcia, C.A., Oréface, F., de Oliveira Lyra, C., Gomes, A.B., França, M., de Amorim Garcia Filho, C.A., 2004. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in Northeastern Brazil. *Ophthalmic Epidemiol* 11, 301–317. <https://doi.org/10.1080/09286580490515170>
- de Thoisy, B., Demar, M., Aznar, C., Carme, B., 2003. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. *J. Wildl. Dis.* 39, 456–459. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.456>
- de-la-Torre, A., Sauer, A., Pfaff, A.W., Bourcier, T., Brunet, J., Speeg-Schatz, C., Ballonzoli, L., Villard, O., Ajzenberg, D., Sundar, N., Grigg, M.E., Gomez-Marin, J.E., Candolfi, E., 2013. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2541. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002541>
- Demar, M., Ajzenberg, D., Maubon, D., Djossou, F., Panchoe, D., Punwasi, W., Valery, N., Peneau, C., Daigre, J.-L., Aznar, C., Cottrelle, B., Terzan, L., Dardé, M.-L., Carme, B., 2007. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin. Infect. Dis.* 45, e88-95. <https://doi.org/10.1086/521246>
- Doby, J.M., Desmonts, G., Beaucournu, J.C., Akinchina, G.T., 1974. [Systematic immunologic study of toxoplasmosis in small wild mammals of France]. *Folia Parasitol.* 21, 289–300.
- Dubey, J., 2009. Toxoplasmosis in animals and humans. Boca Raton: CRC Press.
- Dubey, J.P., 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.* 140, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.018>
- Dubey, J.P., 1997. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology* 115 (Pt 1), 15–20.
- Dubey, J.P., 1996. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *J. Parasitol.* 82, 951–956.
- Dubey, J.P., Ferreira, L.R., Alsaad, M., Verma, S.K., Alves, D.A., Holland, G.N., McConkey, G.A., 2016. Experimental Toxoplasmosis in Rats Induced Orally with Eleven Strains of *Toxoplasma gondii* of Seven Genotypes: Tissue Tropism, Tissue Cyst Size, Neural Lesions, Tissue Cyst Rupture without

- Dubey, J.P., Frenkel, J.K., 1973. Experimental *Toxoplasma* Infection in Mice with Strains Producing Oocysts. *The Journal of Parasitology* 59, 505–512. <https://doi.org/10.2307/3278784>
- Dubey, J.P., Graham, D.H., Dahl, E., Hilali, M., El-Ghaysh, A., Sreekumar, C., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., Lehmann, T., 2003a. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. *Vet. Parasitol.* 114, 89–95.
- Dubey, J.P., Karhemere, S., Dahl, E., Sreekumar, C., Diabaté, A., Dabiré, K.R., Vianna, M.C.B., Kwok, O.C.H., Lehmann, T., 2005. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *J. Parasitol.* 91, 69–72. <https://doi.org/10.1645/GE-410R>
- Dubey, J.P., Laurin, E., Kwok, O.C.H., 2016. Validation of the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens by using cat and mouse bioassay. *Parasitology* 143, 314–319. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001316>
- Dubey, J.P., Lehmann, T., Lautner, F., Kwok, O.C.H., Gamble, H.R., 2015. Toxoplasmosis in sentinel chickens (*Gallus domesticus*) in New England farms: Seroconversion, distribution of tissue cysts in brain, heart, and skeletal muscle by bioassay in mice and cats. *Vet. Parasitol.* 214, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.004>
- Dubey, J.P., Shen, S.K., 1991. Rat model of congenital toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 59, 3301–3302.
- Dubey, J.P., Shen, S.K., Kwok, O.C., Thulliez, P., 1997. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. *Parasitology* 115 (Pt 1), 9–14.
- Dubey, J.P., Sundar, N., Gennari, S.M., Minervino, A.H.H., Farias, N.A. da R., Ruas, J.L., dos Santos, T.R.B., Cavalcante, G.T., Kwok, O.C.H., Su, C., 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.* 143, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.024>
- Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Chockalingam, A., Pena, H.F.J., de Oliveira, L.N., Leifer, C.A., Gennari, S.M., Bahia Oliveira, L.M.G., Su, C., 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet. Parasitol.* 157, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.036>
- Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Rajendran, C., Yabsley, M.J., Thomas, N.J., Beckmen, K.B., Sinnott, D., Ruid, D., Hart, J., Fair, P.A., McFee, W.E., Shearn-Bochsler, V., Kwok, O.C.H., Ferreira, L.R., Choudhary, S., Faria, E.B., Zhou, H., Felix, T.A., Su, C., 2011. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int. J. Parasitol.* 41, 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.06.005>
- 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., 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81, 723–729.
- Dumètre, A., Dardé, M.L., 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 651–661.
- Eichenwald, H., 1948. Experimental toxoplasmosis; transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice. *Am J Dis Child* 76, 307–315.
- Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Cohen, R., Dumètre, A., Yera, H., Gondon, E., Janaud, J.-C., Thulliez, P., 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J. Infect. Dis.* 199, 280–285. <https://doi.org/10.1086/595793>

- Ervynk, A., 2002. Sedentism or Urbanism? On the origin of the commensal black rat (*Rattus rattus*), in: Dobney, K., O'Connor, T.P., Brothwell, D.R. (Eds.), *Bones and the Man: Studies in Honour of Don Brothwell*. Oxbow, Oxford, pp. 95–109.
- Favoreto-Júnior, S., Ferro, E.A., Clemente, D., Silva, D.A., Mineo, J.R., 1998. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, 103–107.
- Flori, P., Hafid, J., Bourlet, T., Raberin, H., Genin, C., Sung, R.T.M., 2002. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *J. Med. Microbiol.* 51, 871–878. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-871>
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E., OLIVEIRA, F., ALMEIDA, E., TEIXEIRA, W., 2002. SENSIBILIDADE COMPARATIVA DO GERBIL (*Meriones unguiculatus*) E DO CAMUNDONGO (*Mus musculus*) INOCULADOS COM OOCISTOS ESPORULADOS DE *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) DA CEPA VEG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 11, 65–69.
- Freyre, A., Fialho, C.G., Bigatti, L.E., Araujo, F. a. P., Falcón, J.D., Mendez, J., González, M., 2009. *Toxoplasma gondii*: congenital transmission in a hamster model. *Exp. Parasitol.* 122, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.004>
- Fujii, H., Kamiyama, T., Hagiwara, T., 1983. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 36, 343–346.
- Fux, B., Nawas, J., Khan, A., Gill, D.B., Su, C., Sibley, L.D., 2007. *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation. *Infect. Immun.* 75, 2580–2590. <https://doi.org/10.1128/IAI.00085-07>
- Galal, L., Ajzenberg, D., Hamidović, A., Durieux, M.-F., Dardé, M.-L., Mercier, A., 2017. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.010>
- Gebreyes, W.A., Dupouy-Camet, J., Newport, M.J., Oliveira, C.J.B., Schlesinger, L.S., Saif, Y.M., Kariuki, S., Saif, L.J., Saville, W., Wittum, T., Hoet, A., Quessy, S., Kazwala, R., Tekola, B., Shryock, T., Bisesi, M., Patchanee, P., Boonmar, S., King, L.J., 2014. The global one health paradigm: challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3257. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003257>
- Gilbert, R.E., Dunn, D.T., Lightman, S., Murray, P.I., Pavesio, C.E., Gormley, P.D., Masters, J., Parker, S.P., Stanford, M.R., 1999. Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol. Infect.* 123, 283–289.
- Gilbert, R.E., Freeman, K., Lago, E.G., Bahia-Oliveira, L.M.G., Tan, H.K., Wallon, M., Buffolano, W., Stanford, M.R., Petersen, E., European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT), 2008. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e277. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000277>
- Glasner, P.D., Silveira, C., Kruszon-Moran, D., Martins, M.C., Burnier Júnior, M., Silveira, S., Camargo, M.E., Nussenblatt, R.B., Kaslow, R.A., Belfort Júnior, R., 1992. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* 114, 136–144.
- Gondim, L.F.P., Mineo, J.R., Schares, G., 2017. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology* 144, 851–868. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000063>
- Gonzalez, L.E., Rojnik, B., Urrea, F., Urdaneta, H., Petrosino, P., Colasante, C., Pino, S., Hernandez, L., 2007. *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats A behavioral analysis. *Behav. Brain Res.* 177, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.012>
- Gotteland, C., Chaval, Y., Villena, I., Galan, M., Geers, R., Aubert, D., Poulle, M.-L., Charbonnel, N., Gilot-Fromont, E., 2014. Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology* 141, 259–268. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001522>

- Grigg, M.E., Bonnefoy, S., Hehl, A.B., Suzuki, Y., Boothroyd, J.C., 2001. Success and Virulence in *Toxoplasma* as the Result of Sexual Recombination Between Two Distinct Ancestries. *Science* 294, 161–165. <https://doi.org/10.1126/science.1061888>
- Grigg, M.E., Sundar, N., 2009. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int. J. Parasitol.* 39, 925–933. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.005>
- Gulinello, M., Acquarone, M., Kim, J.H., Spray, D.C., Barbosa, H.S., Sellers, R., Tanowitz, H.B., Weiss, L.M., 2010. Acquired infection with *Toxoplasma gondii* in adult mice results in sensorimotor deficits but normal cognitive behavior despite widespread brain pathology. *Microbes Infect.* 12, 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.009>
- Handman, E., Remington, J.S., 1980. Antibody responses to *Toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infect. Immun.* 29, 215–220.
- Hejlíček, K., Literák, I., Nezval, J., 1997. Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. *J. Wildl. Dis.* 33, 480–485. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.3.480>
- Hide, G., 2016. Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 14, 335–344. <https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1146131>
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69–75.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566.
- Howe, D.K., Summers, B.C., Sibley, L.D., 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64, 5193–5198.
- Hrdá, S., Votýpka, J., Kodým, P., Flegr, J., 2000. Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. *J. Parasitol.* 86, 657–663. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0657:TNOTGI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0657:TNOTGI]2.0.CO;2)
- Jackson, M.H., Siim, J.C., 1986. Toxoplasmosis in a wild rodent population of central Scotland and a possible explanation of the mode of transmission. *Journal of Zoology* 209, 549–557. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1986.tb03610.x>
- Jacobs, L., 1966. The occurrence of *Toxoplasma* infection in the absence of demonstrable antibodies, in: *Proceedings of the First International Congress of Parasitology, Volume 1.* Elsevier, pp. 176–177.
- Jameson, E.W., Peeters, H.J., 2004. *Mammals of California.* University of California Press.
- Jensen, K.D.C., Camejo, A., Melo, M.B., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G.M., Frickel, E.-M., Ploegh, H.L., Young, L., Saeij, J.P.J., 2015. *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *MBio* 6, e02280. <https://doi.org/10.1128/mBio.02280-14>
- Jiang, T., Shwab, K., Martin, R., Gerhold, R., Rosenthal, B., Dubey, J.P., Su, C., 2018. A partition of *Toxoplasma gondii* genotypes across spatial gradients and among host species, and decreased parasite diversity towards areas of human settlement in North America. *Int. J. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.008>
- Jokelainen, P., Isomursu, M., Näreaho, A., Oksanen, A., 2011. Natural *Toxoplasma gondii* infections in European brown hares and mountain hares in Finland: proportional mortality rate, antibody prevalence, and genetic characterization. *J. Wildl. Dis.* 47, 154–163. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.154>
- Jokelainen, P., Nylund, M., 2012. Acute fatal toxoplasmosis in three Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) caused by genotype II of *Toxoplasma gondii*. *J. Wildl. Dis.* 48, 454–457. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.2.454>

- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp. Parasitol.* 124, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>
- Kannan, G., Moldovan, K., Xiao, J.-C., Yolken, R.H., Jones-Brando, L., Pletnikov, M.V., 2010. *Toxoplasma gondii* strain-dependent effects on mouse behaviour. *Folia Parasitol.* 57, 151–155.
- Kapperud, G., 1978. Survey for toxoplasmosis in wild and domestic animals from Norway and Sweden. *J. Wildl. Dis.* 14, 157–162.
- Kavaliers, M., Colwell, D.D., 1995. Decreased predator avoidance in parasitized mice: neuromodulatory correlates. *Parasitology* 111 (Pt 3), 257–263.
- Khan, A., Ajzenberg, D., Mercier, A., Demar, M., Simon, S., Dardé, M.L., Wang, Q., Verma, S.K., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2014. Geographic separation of domestic and wild strains of *Toxoplasma gondii* in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosome1a. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3182. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003182>
- Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14872–14877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702356104>
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L.V., Belfort, R., Vitor, R.W.A., Silveira, C., Sibley, L.D., 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infect. Dis.* 12, 942–949.
- Khan, A., Miller, N., Roos, D.S., Dubey, J.P., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B., Sibley, L.D., 2011. A monomorphic haplotype of chromosome 1a is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. *MBio* 2, e00228-00211. <https://doi.org/10.1128/mBio.00228-11>
- Khan, A., Taylor, S., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2009. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLoS Genet.* 5, e1000404. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000404>
- Khan, I.A., Hakak, R., Eberle, K., Sayles, P., Weiss, L.M., Urban, J.F., 2008. Coinfection with *Heligmosomoides polygyrus* fails to establish CD8+ T-cell immunity against *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76, 1305–1313. <https://doi.org/10.1128/IAI.01236-07>
- Kijlstra, A., Meerburg, B., Cornelissen, J., De Craeye, S., Vereijken, P., Jongert, E., 2008. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Vet. Parasitol.* 156, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.030>
- Konečný, A., Estoup, A., Duplantier, J.-M., Bryja, J., Bâ, K., Galan, M., Tatard, C., Cosson, J.-F., 2013. Invasion genetics of the introduced black rat (*Rattus rattus*) in Senegal, West Africa. *Mol. Ecol.* 22, 286–300. <https://doi.org/10.1111/mec.12112>
- Kong, J.-T., Grigg, M.E., Uyetake, L., Parmley, S., Boothroyd, J.C., 2003. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* 187, 1484–1495. <https://doi.org/10.1086/374647>
- Langham, N.P.E., 1990. The diet of feral cats (*Felis catus* L.) on Hawke's Bay farmland, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* 17, 243–255.
- Laveran, A., Marullaz, M. 1913. [Recherches expérimentales sur *Toxoplasma gondii*]. *Bull Soc Pathol Exot.* Tome 6.
- Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J.L., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect. Genet. Evol.* 3, 135–141.
- Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E.R., Bahia-Oliveira, L.M.G., Gennari, S.M., Dubey, J.P., 2004. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect. Genet. Evol.* 4, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.01.007>

- Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P., 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 11423–11428. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601438103>
- Lélu, M., Langlais, M., Poulle, M.-L., Gilot-Fromont, E., 2010. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* along an urban-rural gradient. Theor Popul Biol 78, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2010.05.005>
- Lélu, M., Langlais, M., Poulle, M.-L., Gilot-Fromont, E., Gandon, S., 2013. When should a trophically and vertically transmitted parasite manipulate its intermediate host? The case of *Toxoplasma gondii*. Proc. Biol. Sci. 280, 20131143. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1143>
- Liesenfeld, O., Dunay, I.R., Erb, K.J., 2004. Infection with *Toxoplasma gondii* reduces established and developing Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. Infect. Immun. 72, 3812–3822. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3812-3822.2004>
- Lilue, J., Müller, U.B., Steinfeldt, T., Howard, J.C., 2013. Reciprocal virulence and resistance polymorphism in the relationship between *Toxoplasma gondii* and the house mouse. Elife 2, e01298. <https://doi.org/10.7554/eLife.01298>
- Lippens, C., Estoup, A., Hima, M.K., Loiseau, A., Tatard, C., Dalecky, A., Bâ, K., Kane, M., Diallo, M., Sow, A., Niang, Y., Piry, S., Berthier, K., Leblois, R., Duplantier, J.-M., Brouat, C., 2017. Genetic structure and invasion history of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: a legacy of colonial and contemporary times. Heredity (Edinb) 119, 64–75. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.18>
- Long, J.L., 2003. Introduced Mammals of the World: Their History, Distribution and Influence. Csiro Publishing.
- Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M.S., Namasivayam, S., Swapna, L.S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B.P., Ajioka, J.W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J.C., Boyle, J.P., Dardé, M.L., Diaz-Miranda, M.A., Dubey, J.P., Fritz, H.M., Gennari, S.M., Gregory, B.D., Kim, K., Saeij, J.P.J., Su, C., White, M.W., Zhu, X.-Q., Howe, D.K., Rosenthal, B.M., Grigg, M.E., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J.C., Roos, D.S., Sibley, L.D., 2016. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. Nat Commun 7, 10147. <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>
- Lukášová, R., Kobédová, K., Halajian, A., Bártová, E., Murat, J.-B., Rampedi, K.M., Luus-Powell, W.J., 2018. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in birds from South Africa. Acta Trop. 178, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.029>
- Marshall, P.A., Hughes, J.M., Williams, R.H., Smith, J.E., Murphy, R.G., Hide, G., 2004. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. Parasitology 128, 39–42.
- Mateus-Pinilla, N.E., Hannon, B., Weigel, R.M., 2002. A computer simulation of the prevention of the transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms using a feline *T. gondii* vaccine. Prev. Vet. Med. 55, 17–36.
- Maubon, D., Ajzenberg, D., Brenier-Pinchart, M.-P., Dardé, M.-L., Pelloux, H., 2008. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? Trends Parasitol. 24, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.03.012>
- Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M.P., de Thoisy, B., Bonnabau, H., Collinet, F., Boukhari, R., Blanchet, D., Simon, S., Carme, B., Dardé, M.-L., 2011. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. Infect. Genet. Evol. 11, 1378–1387. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.003>
- Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A.-L., Durand, P., Salle, B., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. PLoS Negl Trop Dis 4, e876. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000876>

- Mercier, A., Garba, M., Bonnabau, H., Kane, M., Rossi, J.-P., Dardé, M.-L., Dobigny, G., 2013. Toxoplasmosis seroprevalence in urban rodents: a survey in Niamey, Niger. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 399–407. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013002>
- Minot, S., Melo, M.B., Li, F., Lu, D., Niedelman, W., Levine, S.S., Saeij, J.P.J., 2012. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 13458–13463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117047109>
- Molsher, R., Newsome, A., Dickman, C., 1999. Feeding ecology and population dynamics of the feral cat (*Felis catus*) in relation to the availability of prey in central-eastern New South Wales. *Wildlife Research* 26, 593–607.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Moulin, A.M., 1993. Historical introduction: the Institut Pasteur's contribution. *Research in Immunology* 144, 8–13. [https://doi.org/10.1016/S0923-2494\(05\)80089-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2494(05)80089-6)
- Müller, U.B., Howard, J.C., 2016. The impact of *Toxoplasma gondii* on the mammalian genome. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.009>
- Murphy, R.G., Williams, R.H., Hughes, J.M., Hide, G., Ford, N.J., Oldbury, D.J., 2008. The urban house mouse (*Mus domesticus*) as a reservoir of infection for the human parasite *Toxoplasma gondii*: an unrecognised public health issue? *Int J Environ Health Res* 18, 177–185. <https://doi.org/10.1080/09603120701540856>
- Niang, M., Mbaye, M., 2013. Evolution des exportations de bétail malien au Sénégal suite aux récentes crises.
- Nicolle, C., 1908. Sur une infection a corps de Leishman (on organismes voisins) du gondi. *CR Acad Sci* 147, 736.
- Owen, M.R., Trees, A.J., 1998. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology* 116 (Pt 4), 299–304.
- Paulino, J.P., Vitor, R.W., 1999. Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holtzman rats. *Parasite* 6, 63–66. <https://doi.org/10.1051/parasite/1999061063>
- Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- Peyron, F., McLeod, R., Ajzenberg, D., Contopoulos-Ioannidis, D., Kieffer, F., Mandelbrot, L., Sibley, L.D., Pelloux, H., Villena, I., Wallon, M., Montoya, J.G., 2017. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0005222. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005222>
- Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Hasseine, L., Darde, M.-L., Marty, P., 2011. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging Infect. Dis.* 17, 1327–1328. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101642>
- Poulin, R., 2010. Chapter 5 - Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions, in: Brockmann, H.J., Roper, T.J., Naguib, M., Wynne-Edwards, K.E., Mitani, J.C., Simmons, L.W. (Eds.), *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press, pp. 151–186. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)
- Puckett, E.E., Park, J., Combs, M., Blum, M.J., Bryant, J.E., Caccone, A., Costa, F., Deinum, E.E., Esther, A., Himsforth, C.G., Keightley, P.D., Ko, A., Lundkvist, Å., McElhinney, L.M., Morand, S., Robins, J., Russell, J., Strand, T.M., Suarez, O., Yon, L., Munshi-South, J., 2016. Global population divergence and admixture of the brown rat (*Rattus norvegicus*). *Proc. Biol. Sci.* 283. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1762>

- Reperant, L.A., Hegglin, D., Tanner, I., Fischer, C., Deplazes, P., 2009. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. *Parasitology* 136, 329–337. <https://doi.org/10.1017/S0031182008005428>
- Richomme, C., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., Ajzenberg, D., Mercier, A., Ducrot, C., Ferté, H., Delorme, D., Villena, I., 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet. Parasitol.* 164, 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.014>
- Robert-Gangneux, F., Dardé, M.-L., 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 264–296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Roberts, C.W., Alexander, J., 1992. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology* 104 Pt 1, 19–23.
- Rosenthal, B.M., 2009. How has agriculture influenced the geography and genetics of animal parasites? *Trends Parasitol.* 25, 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.10.004>
- Rosevear, D.R., 1969. The rodents of west Africa. Trustees of the British Museum (Natural History).
- Rudzinski, M., Khoury, M., Couto, C., Ajzenberg, D., 2016. Reactivation of Ocular Toxoplasmosis in Non-Hispanic Persons, Misiones Province, Argentina. *Emerging Infect. Dis.* 22, 912–913. <https://doi.org/10.3201/eid2205.150025>
- Ruiz, A., Frenkel, J.K., 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 1161–1166.
- Santiago, H.C., Oliveira, M.A., Bambilra, E.A., Faria, A.M., Afonso, L.C., Vieira, L.Q., Gazzinelli, R.T., 1999. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 67, 4939–4944.
- Savva, D., Morris, J.C., Johnson, J.D., Holliman, R.E., 1990. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.* 32, 25–31. <https://doi.org/10.1099/00222615-32-1-25>
- Schares, G., Koethe, M., Bangoura, B., Geuthner, A.-C., Randau, F., Ludewig, M., Maksimov, P., Sens, M., Bärwald, A., Conraths, F.J., Villena, I., Aubert, D., Opsteegh, M., Van der Giessen, J., 2018. *Toxoplasma gondii* infections in chickens – performance of various antibody detection techniques in serum and meat juice relative to bioassay and DNA detection methods. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.007>
- Shwab, E.K., Saraf, P., Zhu, X.-Q., Zhou, D.-H., McFerrin, B.M., Ajzenberg, D., Schares, G., Hammond-Aryee, K., van Helden, P., Higgins, S.A., Gerhold, R.W., Rosenthal, B.M., Zhao, X., Dubey, J.P., Su, C., 2018. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>
- Shwab, E.K., Zhu, X.-Q., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
- Sibley, L.D., Ajioka, J.W., 2008. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 329–351. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>
- Smith, R.E., Ganley, J.P., 1972. Ophthalmic survey of a community. 1. Abnormalities of the ocular fundus. *Am. J. Ophthalmol.* 74, 1126–1130.
- Souza, M.C., Fonseca, D.M., Kanashiro, A., Benevides, L., Medina, T.S., Dias, M.S., Andrade, W.A., Bonfá, G., Silva, M.A.B., Gozzi, A., Borges, M.C., Gazzinelli, R.T., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., Silva, J.S., 2017. Chronic *Toxoplasma gondii* Infection Exacerbates Secondary Polymicrobial Sepsis. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00116>

- Splendore, 1908. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. *Rev Soc Scient Sao Paulo* 109–112.
- Stoler, J., al Dashti, R., Anto, F., Fobil, J.N., Awandare, G.A., 2014. Deconstructing “malaria”: West Africa as the next front for dengue fever surveillance and control. *Acta Tropica* 134, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.017>
- Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., Sibley, L.D., 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 414–416. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5844–5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>
- Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>
- Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 36, 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>
- Suzuki, Y., Conley, F.K., Remington, J.S., 1989. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 159, 790–794.
- Thoendel, M., Jeraldo, P.R., Greenwood-Quaintance, K.E., Yao, J.Z., Chia, N., Hanssen, A.D., Abdel, M.P., Patel, R., 2016. Comparison of microbial DNA enrichment tools for metagenomic whole genome sequencing. *J. Microbiol. Methods* 127, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.022>
- Thomasson, D., Wright, E.A., Hughes, J.M., Dodd, N.S., Cox, A.P., Boyce, K., Gerwash, O., Abushahma, M., Lun, Z.-R., Murphy, R.G., Rogan, M.T., Hide, G., 2011. Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. *Parasitology* 138, 1117–1123. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000904>
- Tichy, H., Zaleska-Rutczynska, Z., O'Huigin, C., Figueroa, F., Klein, J., 1994. Origin of the North American house mouse. *Folia Biol. (Praha)* 40, 483–496.
- Torgerson, P.R., Mastroiacovo, P., 2013. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 91, 501–508. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>
- Turner, D.C., Bateson, P., 2013. *The Domestic Cat: The Biology of its Behaviour*. Cambridge University Press.
- Turner, M., Lenhart, S., Rosenthal, B., Zhao, X., 2013. Modeling effective transmission pathways and control of the world's most successful parasite. *Theor Popul Biol* 86, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2013.04.001>
- Velmurugan, G.V., Dubey, J.P., Su, C., 2008a. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet. Parasitol.* 155, 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.021>
- Velmurugan, G.V., Dubey, J.P., Su, C., 2008b. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet. Parasitol.* 155, 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.021>
- Verma, S.K., Calero-Bernal, R., Cerqueira-Cézar, C.K., Kwok, O.C.H., Dudley, M., Jiang, T., Su, C., Hill, D., Dubey, J.P., 2016. Toxoplasmosis in geese and detection of two new atypical *Toxoplasma gondii* strains from naturally infected Canada geese (*Branta canadensis*). *Parasitol. Res.* 115, 1767–1772. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4914-8>

- Vujančić, M., Ivović, V., Kataranovski, M., Nikolić, A., Bobić, B., Klun, I., Villena, I., Kataranovski, D., Djurković-Djaković, O., 2011. Toxoplasmosis in naturally infected rodents in Belgrade, Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 1209–1211. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0119>
- Vyas, A., Kim, S.-K., Giacomini, N., Boothroyd, J.C., Sapolsky, R.M., 2007. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6442–6447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608310104>
- Webster, J.P., 1994. Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 108 (Pt 4), 407–411.
- Webster, J.P., Brunton, C.F., MacDonald, D.W., 1994. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 109 (Pt 1), 37–43.
- Webster, J.P., McConkey, G.A., 2010. *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. *Folia Parasitol.* 57, 95–104.
- Welter, A., Mineo, J.R., Silva, D.A. de O., Lourenço, E.V., Ferro, E.A.V., Roque-Barreira, M.C., da Silva, N.M., 2006. An opposite role is exerted by the acarid *Myocoptes musculus* in the outcome of *Toxoplasma gondii* infection according to the route of the protozoa inoculation. *Microbes Infect.* 8, 2618–2628. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.006>
- Wendte, J.M., Gibson, A.K., Grigg, M.E., 2011. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Vet. Parasitol.* 182, 96–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.018>
- WHO, 2016. WHO | World Malaria Report 2016 [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/> (accessed 8.8.18).
- Witting, P.A., 1979. Learning capacity and memory of normal and *Toxoplasma*-infected laboratory rats and mice. *Z Parasitenkd* 61, 29–51.
- Worth, A.R., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A., 2013. Adaptive host manipulation by *Toxoplasma gondii*: fact or fiction? *Trends Parasitol.* 29, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.004>
- Xiao, J., Yolken, R.H., 2015. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)* 213, 828–845. <https://doi.org/10.1111/apha.12458>
- Zenner, L., Darcy, F., Cesbron-Delauw, M.F., Capron, A., 1993. Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. *Infect. Immun.* 61, 360–363.

Annexes

Annexe 1. Distribution des géotypes de <i>Toxoplasma gondii</i> définis par 11 marqueurs PCR-RFLP ou 15 marqueurs microsatellites.....	147
Annexe 2. Récapitulatif des espèces échantillonnées dans le cadre de l'étude de terrain n°2 et de leurs effectifs.....	148
Annexe 3. Article 4	149
Annexe 4. Article 5	239

Annexe 1. Distribution des génotypes de *Toxoplasma gondii* définis par 11 marqueurs PCR-RFLP ou 15 marqueurs microsatellites.

PCR-RFLP (ToxoDB #) www.toxodb.org ; (Su et al., 2012; Dardé et al., 2014)	Microsatellites (type or geographical designation) (Ajzenberg et al., 2010; Su et al., 2012 Supporting information)
10 (Type I) , 27, 35, 38, 55	Type I
6 , 86	<i>Africa 1</i>
33, 41, 42, 51, 56, 70, 80, 82, 84, 85, 105, 117	
28 , 77	Atypical
203	<i>Africa 3</i>
36, 88	
23, 44, 61, 63, 81, 101, 109, 111 , 134, 135, 136	Atypical
11 , 17, 47, 76, 92, 93, 99, 104, 106, 107, 108, 119, 124, 126, 202	Atypical
19 , 32, 40, 53, 59, 64, 69, 71, 75, 94, 121	Atypical
2 (Type III) , 7, 50, 72, 133, 140	Type III
13	<i>Caribbean 1</i>
12, 31	<i>Caribbean 2</i>
141	<i>Caribbean 3</i>
25, 26, 79, 83, 90, 115, 118, 125, 130	
8, 14 , 21, 45, 46, 67, 78, 114, 116, 120, 123, 138	Atypical
1 (Type II) , 3 (Type II variant) , 128	Type II
127, 129	
66 , 197	Atypical
4, 5 , 39, 49, 74	Atypical
9	<i>Chinese 1</i>
137	
15	Atypical HG16
60 , 95, 98, 100	<i>Amazonian</i>
22, 37, 52, 65	
60 , 97	<i>Amazonian</i>
34, 96	

*The bold genotypes correspond to the most frequent genotypes.

Source : Adapté de Chaichan et al., 2017

Annexe 2. Effectifs des espèces échantillonnées dans le cadre de l'étude de terrain n°2.

Environment	Species	number of sampled individuals	number of bioassay trials	number of isolates
Domestic	Chicken <i>Gallus domesticus</i>	1621	105	61
	Domestic muscovy duck <i>Cairina moschata</i>	303	15	11
	Mallard duck <i>Anas platyrhynchos</i>	3	1	1
	Turkey <i>Meleagris gallopavo</i>	25	0	-
	Guinea fowl <i>Numida meleagris</i>	13	1	1
	Goose <i>Anser anser</i>	2	0	0
	Cat <i>Felis catis</i>	5	3	1
	Sheep <i>Ovis aries</i>	1	1	1
	Goat <i>Capra aegagrus hircus</i>	1	0	-
	Pied Crow <i>Corvus albus</i>	2	2	0
	Black kite <i>Milvus migrans</i>	2	2	0
	Spur-winged goose <i>Plectropterus gambensis</i>	1	0	-
	Giant pouch rat <i>Cricetomys gambianus</i>	3	0	-
	Wild	Orange Weaver <i>Ploceus auranlius</i>	1	0
Hare <i>Lepus</i> spp		1	0	-
African wildcat <i>Felis silvestris lybica</i>		1	1	0
Dove <i>Spilopelia</i> spp		1	1	0
Coucal <i>Centropus</i> spp		1	1	0
Rail <i>Rallus</i> spp		2	1	0
Striped polecat <i>Ictonyx striatus</i>		1	1	0
Pale fox <i>Vulpes pallida</i>		1	1	0
Jackal <i>Canis aureus anthus</i>		2	2	0
Garganey <i>Spatula querquedula</i>		28	8	0
Francolin <i>Pternistis bicalcaratus</i>		12	4	1
Common warthog <i>Phacochoerus africanus</i>		5	3	0
African civet <i>Civettictis civetta</i>		1	1	0
Kob <i>Kobus kob</i>		1	1	0
Total		2040	155	77

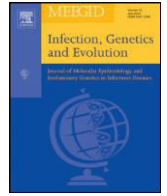
Annexe 3. Article 4

Chaichan P, Mercier A, **Galal L**, Mahittikorn A, Arieu F, Morand S, Boumédiène F, Udonsom R, Hamidovic A, Murat JB, Sukthana Y, Dardé ML. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017 Jun 3;53:227-238.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

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

Review

Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents

P. Chaichan^a, A. Mercier^a, L. Galal^a, A. Mahittikorn^b, F. Arie^e, S. Morand^d, F. Boumédiène^a, R. Udonsom^b,
A. Hamidovic^a, J.B. Murat^{a,c}, Y. Sukthana^b, M.L. Dardé^{a,c,*}

^a INSERM UMR_S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges 87025, France

^b Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand

^c Toxoplasma Biological Resource Center, CHU Limoges, 87042 Limoges, France

^d Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)-Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) Animal et Gestion Intégrée des Risques, Centre d'Infectiologie Christophe Mérieux du Laos, Vientiane, Lao Democratic People's Republic

^e Institut Cochin Inserm U1016, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Cochin, Paris, France

a r t i c l e i n f o

Article history:

Received 20 February 2017

Received in revised form 1 June 2017

Accepted 2 June 2017

Available online 03 June 2017

Keywords:

Toxoplasma gondii

Asia

Genetic diversity

Rodent migration

PCR-RFLP

Microsatellite markers

a b s t r a c t

Defining the pattern of genetic diversity of *Toxoplasma gondii* is important to understand its worldwide distribution. During the last decades, a large number of studies have been published on *Toxoplasma* genotypes circulating in Europe, in North and South America. Two continents are still largely unexplored, Africa and, to a less extent, Asia. In this last continent, an increasing number of publications reported genotypes circulating in diverse provinces of China, but very few data are available for other Asian countries. After a systematic database search, 47 papers related to *T. gondii* genotypes in Asia were analyzed. Genetic characterization of DNA was performed by microsatellite markers, or more usually by a multiplex PCR using 11 PCR-RFLP markers, allowing data comparison to draw a first global picture of the population structure of this parasite throughout Asia. Overall, 390 isolates or DNA extracts were completely typed by PCR-RFLP and/or microsatellite marker methods, revealing 36 different PCR-RFLP or equivalent microsatellite genotypes: 15 genotypes identified by a ToxoDB number and 21 atypical or unique genotypes. The most common genotype found in Asia is the genotype ToxoDB#9 (*Chinese 1*). The clonal types I, II and II variant, and III were also commonly found in Asia. The geographical distribution of these genotypes across Asia may reflect either a continuum with Europe for the western part of Asia (presence of Type II), or the circulation of strains through animal migration or human activities between Africa and the Southwestern part of Asia (*Africa 1* genotype in Turkey or ToxoDB#20 both I Sri-Lanka and in Ethiopia or Egypt). Although there are some indications of a genetic population structure in Southeast Asian countries different from the rest of Asia, more studies in this tropical part of Asia will be necessary for a region which represent as well as Africa one of the missing links of the *T. gondii* genetic diversity.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	228
2. Materials and methods.....	228
2.1. Literature search.....	228
2.2. Selection of studies.....	228
3. Results.....	229
3.1. Genetic diversity in Central and Eastern Asia.....	232
3.1.1. China.....	232
3.1.2. South Korea.....	232
3.1.3. Japan (not presented in Table 2 and Fig. 2).....	232

* Corresponding author at: Laboratoire de Parasitologie, INSERM UMR 1094, Faculté de Médecine de Limoges, 2 Rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France.
E-mail address: marie-laure.darde@unilim.fr (M.L. Dardé).

3.2. Genetic diversity in Southeast Asia	232
3.2.1. Indonesia	232
3.2.2. Malaysia	233
3.2.3. Myanmar	233
3.2.4. Vietnam	233
3.3. Genetic diversity in Western Asia	233
3.3.1. Sri Lanka	233
3.3.2. India (not presented in Table 2 and Fig. 2)	233
3.3.3. Iran	233
3.3.4. Turkey	233
3.3.5. Qatar	234
3.3.6. United Arab Emirates	234
3.4. Genotypes shared between Asia and other continents	234
4. Discussion	234
Role of funding source and conflict of interest	236
References	236

1. Introduction

Toxoplasma gondii is one of the most common parasites, infecting human and other warm-blooded animals. It is estimated that *T. gondii* infects one third of the world population (Weiss and Dubey, 2009). Human infection rates vary around the world depending on several sociogeographical factors. Acquisition of *T. gondii* infection is commonly acquired by the ingestion of tissue cysts that contain bradyzoites or by the ingestion of oocysts containing sporozoites. The sources of human infection could vary greatly between different ethnic groups and different geographical locations.

Toxoplasma gondii strains have now been isolated and identified in a large number of hosts (humans and wild and domestic animals). Several molecular markers have been developed to evaluate *T. gondii* genetic diversity. According to the techniques used for characterizing *Toxoplasma* strains, different designations may be encountered. Correspondence between these designations is presented in Table 1. The last global population structure picture based on DNA sequence typing and whole genome sequencing of 62 representative strains identified 16 haplogroups originating from 6 ancestral populations or clades (Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016). They clustered genotypes defined by multilocus markers, either a set of 11 PCR-RFLP genetic markers (ToxoDB#1, #2, #3 ...) (Su et al., 2006, 2010, ToxoDB website: <http://toxodb.org/toxo/>) or a set of 15 microsatellite (MS) markers (Ajzenberg et al., 2010).

The global distribution of *T. gondii* genotypes is widely known in Europe, North and South America. The clonal lineages Type II and, to a less extent, Type III predominate in Europe (Dardé et al., 2014). They are also present in North America, but a fourth clonal lineage (haplogroup 12) and other atypical genotypes are prevalent in this part of the world (Dubey et al., 2011). A high diversity was found in South America with no predominant genotype (Shwab et al., 2014). The diversity on the African continent is less well known: apart from Type II and III, other genotypes were identified by MS markers as *Africa 1* (belonging to haplogroup 6) that circulates in large area of Western and Central Africa and *Africa 3* in Gabon (Mercier et al., 2010), or by PCR-RFLP markers such as the ToxoDB#20 genotype found in Egypt (Al-Kappany et al., 2010) and Ethiopia (Dubey et al., 2013).

In Asia, an increasing number of studies have been conducted on strains circulating in China. A largely predominant genotype, *Chinese 1* (ToxoDB#9) is found in diverse provinces of China. But little is known about strains circulating in other Asian countries. This study aims through a literature review on genetic diversity of *T. gondii* in Asia to understand the circulation and propagation of *T. gondii* strains in Asia, and to propose hypotheses about their relations with strains circulating on neighboring continents.

2. Materials and methods

2.1. Literature search

To identify published studies on genetic characterization of *T. gondii* strains in Asia, we conducted a systematic search of the literature published in English until September 2016. We used online databases MEDLINE and Google Scholar to find the information. The keywords and research equations used were: *Toxoplasma gondii* [AND] genotypes [AND] Asia, and *Toxoplasma gondii* [AND] genotypes [AND] each country in Asia (Fig. 1).

Box 1 List of Asian countries selected for literature search. Afghanistan, Armenia, Azerbaijan, Bahrain, Bangladesh, Bhutan, Brunei, Cambodia, China, Cyprus, Georgia, India, Indonesia, Iran, Iraq, Israel, Japan, Jordan, Kazakhstan, Korea, Kuwait, Kyrgyzstan, Laos, Lebanon, Malaysia, Maldives, Mongolia, Myanmar, Nepal, Oman, Pakistan, Palestine, Philippines, Qatar, Russia, Saudi Arabia, Singapore, Sri Lanka, Syria, Taiwan, Tajikistan, Thailand, Timor Leste, Turkey, Turkmenistan, United Arab Emirates, Uzbekistan, Vietnam, Yemen.

*Underlined countries correspond to the countries where *T. gondii* strains were genotyped.

2.2. Selection of studies

Articles were selected based on their titles and then their abstracts. Only those articles that met the exclusion criteria were finally included. Those retained were read in full. Exclusion criteria were: (i) publications that do not describe *T. gondii* genotypes in Asia, (ii) publications using genetic characterization methods with less than 5 typing markers, considering that they do not allow a reliable genotyping (Fig. 1). However, some papers presenting incomplete genotypes were considered for discussion, notably for countries where no other genotyping data were available (Japan, India), but they were not considered for the global picture presented in Table 2 and Fig. 2. For publications before 2010 using PCR-RFLP markers, the genotype number was not defined, and the database ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>) was used to attribute a ToxoDB genotype number according to the combination of alleles. It was also used to retrieve geographical distribution of a given genotype outside Asia. The results of literature review were classified by country.

Table 1
Distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes defined by 11 PCR-RFLP or 15 MS markers in the different haplogroups and ancestral populations.

Whole genome sequencing (clades) (Lorenzi et al., 2016)	Sequence typing (haplogroup) (Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016)	PCR-RFLP (ToxoDB#) www.toxodb.org ; (Su et al., 2012; Dardé et al., 2014)	Microsatellites (type or geographical designation) ^a (Ajzenberg et al., 2010; Su et al., 2012 Supporting information)
A	1	10 (Type I), 27, 35, 38, 55	Type I
	6	6, 86	<i>Africa 1</i>
	7	33, 41, 42, 51, 56,70, 80, 82, 84, 85, 105, 117	Atypical
	14	28, 77	<i>Africa 3</i>
	15	203	Atypical
B	4	36, 88	Atypical
	8	23, 44, 61, 63, 81, 101, 109, 111, 134, 135, 136	Atypical
C	3	11, 17, 47, 76, 92, 93, 99, 104, 106, 107, 108, 119, 124, 126, 202	Atypical
		19, 32, 40, 53, 59, 64, 69, 71, 75, 94, 121	Type III
		2 (Type III), 7, 50, 72, 133, 140	<i>Caribbean 1</i>
D	9	13	<i>Caribbean 2</i>
	2	12, 31	<i>Caribbean 3</i>
		141	Atypical
		25, 26, 79, 83, 90, 115, 118, 125, 130	Type II
E	11	8, 14, 21, 45, 46, 67, 78, 114, 116, 120, 123, 138	Atypical
	12	1 (Type II), 3 (Type II variant), 128	Atypical
	13	127, 129	<i>Chinese 1</i>
F	16	66, 197	Atypical HG16
	5	4, 5, 39, 49, 74	<i>Amazonian</i>
	10	9	<i>Amazonian</i>
		137	
		15	
		60 ^b , 95, 98, 100	
		22, 37, 52, 65	
		60 ^b , 97	
		34, 96	

*The underlined genotype numbers are the genotypes found in Asia which have been included in a given haplogroup.

**The bold genotypes correspond to the most frequent genotypes of the haplogroup.

^a MS genotypes corresponding to PCR-RFLP genotypes on the same line in the table.

^b ToxoDB #60 was found by Su C. et al. (2012) within both Haplogroup 5 and 10.

3. Results

In Asia, a total of 414 samples were genotyped with a method using at least 5 markers. Actually, only 4 studies used less than 9 markers: two from Malaysia (15 isolates genotyped by 7 PCR-RFLP markers) (Puvanuesuaran et al., 2013a, 2013b), one from Shanghai (1 isolate typed by 5 PCR-RFLP markers and UPRT-1 sequencing) (Zhou et al., 2013), and one from Iran (16 isolates typed with 5 MS markers and GRA6 sequencing) (Zia-Ali et al., 2007). They were considered for building the global pattern of *T. gondii* genotypes in Asia. Among the studies

using 9-11 PCR-RFLP markers, 24 isolates or DNAs were not fully genotyped and the authors themselves considered that the ToxoDB genotype could not be determined. One study (Li et al., 2014) used MS markers for analyzing 28 samples that were already analyzed by PCR-RFLP markers in other studies (Wang et al., 2012, 2013a, 2013b; Chen et al., 2011). So, 390 samples were considered for our analysis (Table 2).

These 390 samples revealed 36 different PCR-RFLP genotypes (15 genotypes identified by a ToxoDB number and 21 atypical or unique genotypes) (Table 2). For the studies using MS markers or other markers, results were expressed as type lineages or, when possible, as equivalent

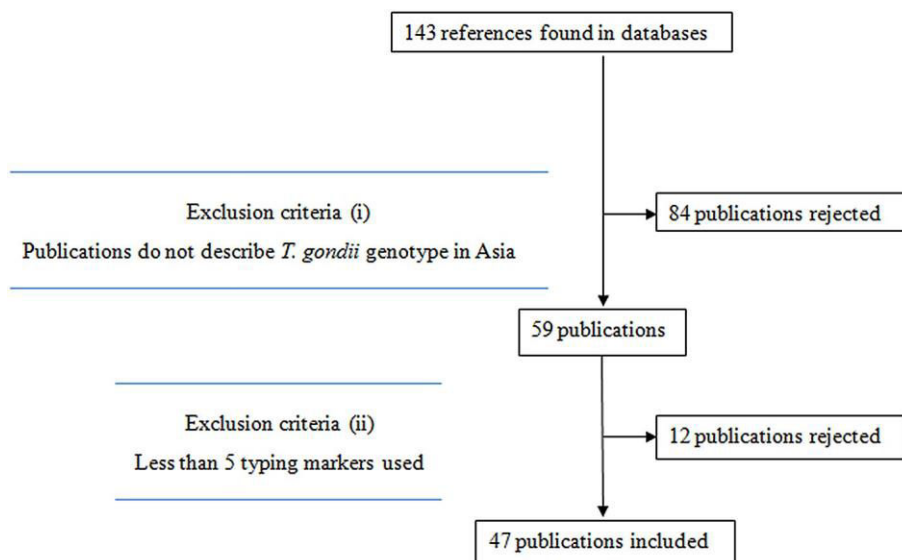


Fig. 1. Flow chart showing the selection procedure for the publications.

Table 2
Different isolates or DNAs of *T. gondii* from Asia with a complete PCR RFLP or MS genotypes.

Countries	Samples	Sample size (isolate/DNA)	Techniques	Genotypes (#ToxoDB number)	References
China North Beijing Shanxi	Stray cats	11 isolates	PCR-RFLP 11 markers	11 #9	Qian et al., 2012
	Cats	2 isolates ^b	15 MS markers	2 <i>Chinese 1</i> (eq. #9) ^a	Li et al., 2014 ^b
	Cats	2 isolates	PCR-RFLP 9 markers	2 #9	Chen et al., 2011
China Northeast Jilin	Free living <i>Microtus fortis</i> (reed vole)	8 DNAs	PCR-RFLP 10 markers	4 #9 4 #10	Zhang et al., 2014
	Bat	3 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	2 #9 1 #10	Qin et al., 2014
	Arctic foxes (<i>Vulpes lagopus</i>)	2 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	2 #10	Zhang et al., 2016
	Wild waterfowls	2 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	2 #9	Zhang et al., 2015
	Cattle Sika deer	1 DNAs 6 DNAs	PCR-RFLP 11 markers PCR-RFLP 11 markers	1 #10 6 #9	Ge et al., 2014 Cong et al., 2016
Liaoning	Pigs	15 isolates	PCR-RFLP 10 markers	13 #9 2 #3	Wang et al., 2016
Heilongjiang	Arctic foxes (<i>Vulpes lagopus</i>)	2 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	2 #9	Zhang et al., 2016
China Northwest Gansu	White yaks	2 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	2 #9	Qin et al., 2015
	Ground-tit (house sparrow)	4 DNAs	PCR-RFLP 9 markers	4 #3	Cong et al., 2013
	Pet birds	4 DNAs	PCR-RFLP 10 markers	4 #3	Cong et al., 2014
	Pig	1 isolate	PCR-RFLP 10 markers	1 #9	Zhou et al., 2009
Qinghai	Sheep	1 isolate	PCR-RFLP 10 markers	1 #3	Zhou et al., 2009
	Qinghai vole (<i>Microtus fuscus</i>)	6 DNAs	PCR-RFLP 10 markers	4 #10 2 new genotypes	Zhang et al., 2013
	Plateau pika (<i>Ochotona curzoniae</i>)				
	Tibetan ground-tit (<i>Pseudopodoces huililis</i>)				
China West Xinjiang	Wild birds	2 DNAs	PCR-RFLP 10 markers	2 #3	Huang et al., 2012
China Southwest Guizhou	Pigs, dogs, cats	5 isolates	PCR-RFLP 11 markers	5 #9	Li et al., 2015
	Cats	5 isolates	PCR-RFLP 11 markers	5 #9	Wang et al., 2013b
	Pigs Cat	4 isolates 1 isolate ^b	15 MS markers	4 #9 1 <i>Chinese 1</i> (eq. #9) ^a	Li et al., 2014 ^b
	Black goats	8 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	1 #9 7 #10	Miao et al., 2015
Yunnan	Bats	2 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	2 #10	Jiang et al., 2014
	Cats	16 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	1 #1 1 #3 11 #9 1 #20 2 #225	Tian et al., 2014
Guangxi	Bats	3 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	1 #9 2 #10	Jiang et al., 2014
Sichuan Chongqing	Pigs Pig	3 DNAs 1 DNA	PCR-RFLP 11 markers PCR-RFLP 11 markers	3 #9 1 #9	Jiang et al., 2013 Jiang et al., 2013
China Center Henan	Cats	9 isolates	PCR-RFLP 10 markers	1 #1 1 #2 6 #9 1 #17	Yang et al., 2015
	Giant panda	1 DNA	PCR-RFLP 10 markers	1 atypical genotype	Ma et al., 2015
	Pet dogs	2 DNAs	PCR-RFLP 11 markers	1 new genotype	Qian et al., 2015
	Pigs	13 DNAs	PCR-RFLP 10 markers	6 #9 7 #10	Zhou et al., 2010
Anhui	Humans, cancer patients	9 DNAs	PCR-RFLP 10 markers	9 #9	Wang et al., 2015
	Humans, cancer patients	2 isolates	PCR-RFLP 10 markers	1 #1 1 #204	Wang et al., 2013a
	Chicken	1 isolate	PCR-RFLP 11 markers	1 #225	Wang et al., 2013b
	Cats	2 isolates ^b	15 MS markers	2 <i>Chinese 1</i> (eq. #9)	Li et al., 2014 ^b
	Pigs	1 isolate ^b		1 <i>Chinese 1</i> (eq. #9)	

Table 2 (continued)

Countries	Samples	Sample size (isolate/DNA)	Techniques	Genotypes (#ToxoDB number)	References	
Hubei	Cats	2 isolates	PCRRFLP9 markers	2 #9	Chen et al., 2011	
	Pigs	2 DNAs, 1 isolate	PCRRFLP9 markers	1 #9	Wang et al., 2012	
	Cats	6 isolates	PCRRFLP10 markers	2 #213 6 #9	Wang et al., 2013a	
	Vole	1 isolate	PCRRFLP11 markers	1 #9	Wang et al., 2013b	
	Cats	12 isolates ^b	15 MS markers	12 <i>Chinese 1</i> (eq. #9)	Li et al., 2014 ^b	
	Cats	8 isolates	PCRRFLP9 markers	6 #9 2 # Chinese 2	Chen et al., 2011	
China South Hainan Hunan Guangdong	Pigs	3 DNAs	PCRRFLP10 markers	3 #10	Zhou et al., 2010	
	Geese	2 DNAs	PCRRFLP10 markers	2 #1	Rong et al., 2014	
	Pig	1 isolate	PCRRFLP10 markers	1 #10	Zhou et al., 2009	
	Cats	17 isolates	PCRRFLP11 markers	15 #9 2 #18	Dubey et al., 2007c Zhou et al., 2009	
	Cats	8 isolates	PCRRFLP10 markers	8 #9	Zhou et al., 2009	
	Pig	2 isolates		2 #9		
	Human	1 isolate		1 #9		
	Bat	2 DNAs	PCRRFLP11 markers	2 #10		Qin et al., 2014
	Pig	1 DNA	PCRRFLP11 markers	1 #3		Jiang et al., 2013
	Humans, AIDS patients	2 isolates	PCRRFLP10 markers	1 #9 1 #10		Wang et al., 2013a
	Cats	2 isolates ^b	15 MS markers	2 <i>Chinese 1</i> (eq. #9)		Li et al., 2014 ^b
	Cats	2 isolates	PCRRFLP9 markers	2 #9	Chen et al., 2011	
	China East Shanghai	Rabbits	1 isolate	PCRRFLP5 markers + UPRT-1 sequencing	1 Type III	Zhou et al., 2013
		Human	1 isolate	PCRRFLP10 markers	1 #10	Zhou et al., 2009
Jiangsu	Rodents	4 DNAs	PCRRFLP10 markers	4 #9	Yan et al., 2014	
	Mice	3 DNAs		3 #9	Zhou et al., 2009	
	Pig	1 isolate	PCRRFLP10 markers	1 #10		
	Cats	8 isolates	PCRRFLP10 markers	3 #9 1 #10 4 #205		Wang et al., 2013a
	Cats	8 isolates ^b	15 MS markers	3 <i>Chinese 1</i> (eq. #9) 1 Type 1 4 eq. #205	Li et al., 2014 ^b	
Jiangxi	Bat	3 DNAs	PCRRFLP11 markers	3 #9	Qin et al., 2014	
	Pigs	12 DNAs	PCRRFLP11 markers	12 #9	Jiang et al., 2013	
Shandong	Human, cancer patients	17 DNAs	PCRRFLP11 markers	8 #9 9 #10	Cong et al., 2015	
	Cats	5 isolates	PCRRFLP10 markers	5 #9	Wang et al., 2013a	
	Artic foxes (<i>Vulpes lagopus</i>)	1 DNA	PCRRFLP11 markers	1 #9	Zhang et al., 2016	
Fujian	Zoo wildlife and Pet birds	3 DNAs	PCRRFLP12 markers	1 #2 1 #9 1 #10	Chen et al., 2015	
	Wild bird	1 DNA	PCRRFLP10 markers	1 #10	Huang et al., 2012	
Zhejiang	Human	1 isolate	PCRRFLP10 markers	1 atypical genotype	Zhou et al., 2009	
South Korea	Human, ocular lesion	1 isolate	PCRRFLP9 markers	1 #10	Quan et al., 2008	
Indonesia 12 towns (not specified)	Free-range chickens	1 isolate	PCRRFLP10 markers	1 #89	Dubey et al., 2008	
Malaysia Peninsular Forests of Pahang	Wild boars	11 isolates	PCRRFLP7 markers	11 Type I	Puvanesuaran et al., 2013a	
Peninsular	Free-range ducks	4 isolates	PCRRFLP7 markers	4 Type I	Puvanesuaran et al., 2013b	
Myanmar South, Sedon and Wutao counties	Bats	19 DNAs	PCRRFLP11 markers	4 #10 15 atypical genotypes	Sun et al., 2013	
Vietnam 7 provinces, Binh Phuoc, Binh Duong, Dong Nai, Tay Ninh, Tien Giang, Ben Tre and Long An	Unwanted dogs	8 isolates	PCRRFLP11 markers	4 #9 4 #18	Dubey et al., 2007a	

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Countries	Samples	Sample size (isolate/DNA)	Techniques	Genotypes (#ToxoDB number)	References
Sri Lanka	Street dogs	24 isolates	PCRRFLP 11 markers	3 #2 1 #9 9 #20 11 atypical (identical genotype)	Dubey et al., 2007b
Iran Tehran and Mazandaran	Ducks Stray cats Humans Sheep Free-range chickens	1 isolate 2 isolates 3 isolates 4 isolates 6 isolates	5 MS markers GRA6 sequencing	1 Type III 2 Type II 2 Type II 1 Type III 2 Type II 2 Type III 6 Type III	Zia-Ali et al., 2007
Turkey Ankara, Balikesir Anatolia	Newborns	2 isolates	15 MS markers	2 <i>Africa 1</i>	Döşkaya et al., 2013
Izmir	Stray cats	22 isolates	15 MS markers	2 Type III 19 Type II 1 <i>Africa 1</i>	Can et al., 2014
Qatar	Sand cats	1 isolate	PCRRFLP 11 markers	1 #3	Dubey et al., 2010
United Arab Emirates	Sand cats	3 isolates	PCRRFLP 11 markers	2 #20 1 atypical	Dubey et al., 2010

^a Equivalent ToxoDB genotype number in studies using MS markers.

^b Isolates analyzed in Li et al. (2014) were identical to those analyzed in Wang et al. (2012, 2013a, 2013b) and Chen et al. (2011).

ToxoDB genotype. In the study by Li et al. (2014), MS markers were in agreement with PCR-RFLP genotyping. The most common genotype found in Asia was the genotype ToxoDB#9 (*Chinese 1*). This genotype was mostly found in China and, to a less extent in Sri Lanka and Vietnam. The genotypes ToxoDB#1 and #3 (Type II and II variant), #2 (Type III), and #10 (Type I) were also commonly found in Asia. The majority of genotyped strains were from China (278/390, 71.3%). The remaining 107 strains were distributed in the following countries: 24/390 (6.2%) in Sri Lanka, 24/390 (6.1%) in Turkey, 19/390 (4.9%) in Myanmar, 16/390 (4.1%) in Iran, 15/390 (3.8%) in Malaysia, 8/390 (2.1%) in Vietnam, 3/390 (0.8%) in United Arab Emirates, 1/390 (0.2%) in Indonesia, 1/390 (0.2%) in Korea, and 1/390 (0.2%) in Qatar.

3.1. Genetic diversity in Central and Eastern Asia

3.1.1. China

We decided to present *T. gondii* genotypes found in China per region, North, Northeast, Northwest, South, Southwest, East, West and Center of China (Fig. 2). Currently, a total of 278 samples (154 DNA extracts and 124 isolates) were characterized. The samples included 33 human and 245 animal strains (192 from domestic animals and 53 from wild animals). Thirteen ToxoDB genotypes and 5 atypical genotypes were identified in China. The most common genotype was ToxoDB#9 (*Chinese 1*) with 182/278 strains (65.5% of total samples). It is largely distributed over China, but mainly found in the Northern, Southern and Center parts of the country. ToxoDB#10 (Type I) is the second most common genotype found in China with 51 strains over 278 (18.3%), mainly in the eastern and southwestern provinces of China, respectively 14/68 (20.6%) and 11/48 (22.9%) strains of these regions. The clonal types II (ToxoDB#1 and #3), and III (ToxoDB#2), and the genotype #205 were less frequently found. Altogether, Type II (5 ToxoDB#1) and II variant (15 ToxoDB#3) represented 7.2% of the genotypes (20/278). Thirteen of them (65%) were found in the western (Xinjiang),

northwestern (Gansu and Qinghai) and central (Henan and Anhui) provinces of China. The 7 remaining samples are occasionally found in Southwest (2 in cats from Yunnan), South (2 in Hainan geese and 1 in a pig from Guangdong), and Northeast (2 in Liaoning pigs). Only 3 samples were typed as Type III or ToxoDB#2, 1 in Henan, a province from central China, and 2 in the eastern parts of the country (1 in a Shanghai rabbit, 1 in Fujian). Four samples from Jiangsu province in the eastern part of the country gave genotype ToxoDB#205. Other genotypes are infrequently encountered in China (15/278): #17 (1 sample in Henan), #18 (2 samples in Guangdong), #20 (1 sample in Yunnan), #204 (1 in Anhui), #213 (2 in Anhui), #225 (1 in Anhui) and 7 atypical strains not referenced in ToxoDB.

3.1.2. South Korea

One Type I isolate named KI-1 was isolated from a patient with ocular lesions (Quan et al., 2008; Lin et al., 2005). Two other studies were conducted on *Toxoplasma* genotyping in this country. Although they were not retained for this analysis because relying on an insufficient number of markers, they also showed Type I alleles for DNA samples of stray-cats (Kim et al., 2009) and rodents (Hong et al., 2014).

3.1.3. Japan (not presented in Table 2 and Fig. 2)

There is no publication using more than 5 genetic markers for *Toxoplasma* genotyping in Japan. Two studies based on GRA6 PCR-RFLP revealed either Type I, II or III alleles for this gene, but GRA6 sequencing showed a higher polymorphism (Zakimi et al., 2006; Kyan et al., 2012).

3.2. Genetic diversity in Southeast Asia

3.2.1. Indonesia

One isolate from free-range chicken gave the genotype ToxoDB#89 (Dubey et al., 2008). This genotype ToxoDB#89 was found only in Indonesia.

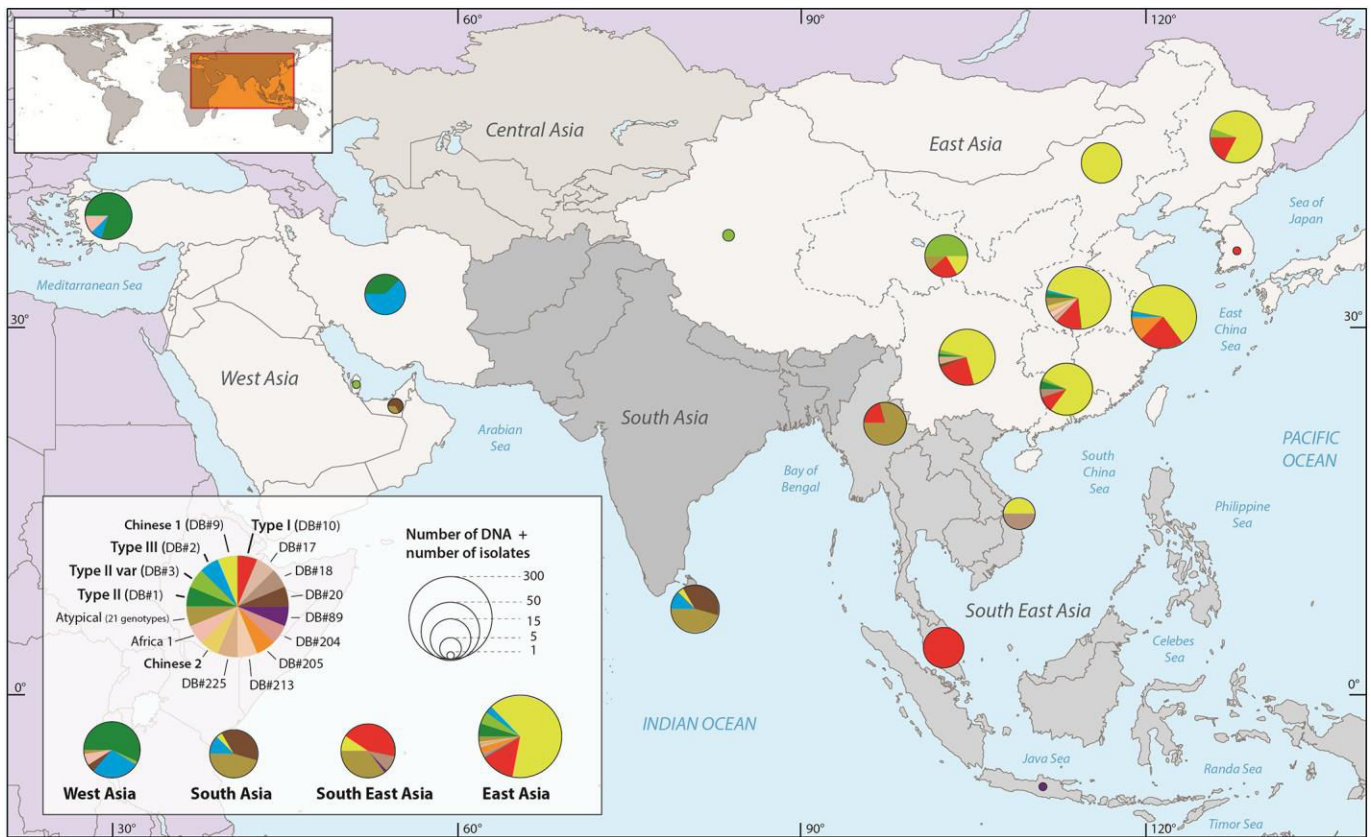


Fig. 2. Geographical distribution of *T. gondii* strains in Asia.

3.2.2. Malaysia

Of the 19 isolates obtained in Peninsular Malaysia from 4 free-range ducks (2 isolates per duck) and 11 wild boars, 15 samples were genotyped as Type I with 7 PCR-RFLP markers. Four samples had incomplete typing, 2 with Type II alleles and 2 with Type I alleles (Puvanեսuara et al., 2013a, 2013b). The 11 wild boars that were all infected by *T. gondii* Type I were living in rainforests of Pahang which host a variety of wild felids. The 4 other Type I were found in free-range ducks from the district of Kulim in Kedah state, close to the Thai border. This suggests that Type I may be widely distributed in this country in wild animals as well as in domestic ones.

3.2.3. Myanmar

Nineteen DNA extracts were collected from bats in Sedon and Wutao counties, Myanmar, close to Yunnan province, China. Four extracts belonged to genotype ToxoDB#10 and the 15 remaining samples gave 14 different atypical genotypes with a majority of Type I alleles revealing a high diversity among these wild animals (Sun et al., 2013).

3.2.4. Vietnam

A total of 8 strains isolated from unwanted dogs were characterized. Two genotypes were found: 4 ToxoDB#9 and 4 ToxoDB#18 genotypes (Dubey et al., 2007a). This last genotype was also described in the nearby province of Guandong in South China (Dubey et al., 2007c). Overall, for these tropical South East Asian countries, only 43 *Toxoplasma* strains were completely characterized, most of them (34/43) were Type I strains or atypical genotypes with a majority of Type I alleles. They were mainly found in wild animals (wild boars in Malaysia, bats in Myanmar). The presence of the ToxoDB#9 genotype in Vietnam confirms its large distribution in Asia.

3.3. Genetic diversity in Western Asia

3.3.1. Sri Lanka

A total of 24 isolates from street dogs were characterized. A variety of genotypes was found in this relatively small number of samples, 3 corresponded to genotype ToxoDB#2 (type III), 1 to ToxoDB#9, 9 to ToxoDB#20 and 11 presented a single atypical genotype, not referenced in ToxoDB. (Dubey et al., 2007b).

3.3.2. India (not presented in Table 2 and Fig. 2)

On the large neighboring Indian subcontinent, a recent genotyping study based on PCR-RFLP and sequencing of 4 markers (β TUB, GRA6, alternative SAG2 and SAG3) on DNA from tissues obtained at postmortem in AIDS patients suggested that majority of the patients (22/25; 88%) in South India are infected with strains different from the archetypal lineages I, II, and III and presenting different combinations of Type II and III alleles for these markers (Vijaykumar et al., 2016). The genotyping method did not allow concluding to a known genotype. Only one strain presented a Type I allele at one marker (β TUB). One strain was suspected to be Type III, the 4 markers showing Type III alleles. This study revealed a relatively high genetic diversity as 16 different genotypes were identified for these 25 Indian patients.

3.3.3. Iran

Six isolates from Tehran and Mazandaran, Iran were characterized as Type II and 10 isolates as Type III. These isolates derived from ducks, stray cats, sheep, free-range chickens and humans (Zia-Ali et al., 2007).

3.3.4. Turkey

In Izmir, Turkey, 22 isolates from stray cats were characterized using 15 MS markers. Nineteen samples were identified as Type II genotype, 2

as Type III genotype, 1 as *Africa 1* genotype (HG 6) (Can et al., 2014). This last genotype, *Africa 1*, was also present in two strains from Anatolia, named Ankara and Ege-1 isolated from newborns with congenital toxoplasmosis. Ankara and Ege-1 strain killed mice in 4-5 days (Döşkaya et al., 2013).

3.3.5. Qatar

Only one sample (ToxoDB#3 genotype) was recovered from sand cats in Qatar (Dubey et al., 2010).

3.3.6. United Arab Emirates

Of the three samples from sand cats that were collected and typed, 2 belonged to genotype ToxoDB#20 and 1 had an incomplete atypical genotype (Dubey et al., 2010).

3.4. Genotypes shared between Asia and other continents

To appreciate the possible circulation of genotypes between Asia and other continents, we focused on the distribution of genotypes found in Asia in other locations. This search was mainly based on data obtained from the toxodb website and it may not be exhaustive. Isolates from human origin were excluded as their geographical origin could not be ascertained (Table 3).

4. Discussion

As any compilation of data, several biases may be considered for this literature review. The main one concerns the convenient sampling not representative of the whole genetic diversity that may exist on this large continent. Several major countries such as India, central Asian and most of the South-East Asian countries were not or poorly sampled. The overwhelming presence of ToxoDB#9 is partly due to the fact that more than 71% of samples originated from China, mainly the Eastern and South part of this country. Another bias concerns the mostly used genotyping method, namely PCR-RFLP that was initially designed to identify SNPs that are biallelic among archetypal strains. Informative polymorphisms may be lost, leading to underestimation of the true extent of allelic diversity. However, the fact that we selected only papers using more than 5 markers minimized the risk of misidentification. The large geographical distribution ToxoDB#9, also designated as *Chinese 1*, throughout different provinces of China and its dispersion in other Asian countries, such as Vietnam and Sri Lanka, is a criterion for

considering *Chinese 1* as a major clonal lineage together with the other clonal lineages such as Type I, II or III. The emergence of Type I, II or III clonal lineages has been reported to the apparition of agriculture and domestication of animals, 10,000 years ago in the Fertile Crescent of Near East (Khan et al., 2007), favoring the selection of a few number of strains well adapted to domestic animals. Similarly, domestication of cats and intermediate hosts is very ancient in China and could have led to a clonal expansion of *Chinese 1* (Li et al., 2014). Domestication of pigs and cattle is reported to have occurred in China 9000-10,000 years ago, that of sheep and goats about 3600-3000 BCE in Gansu and Qinghai provinces (Jing, 2008). Up to now, the presence of domestic cats seems to have occurred later than in the Near East. Archeological findings dated it back to 5300 years ago in an early agricultural village in Shaanxi, China (Hu et al., 2014).

Sequencing of introns recognized *Chinese 1* genotype as belonging to haplogroup 13 (Khan et al., 2011) and whole genome sequencing placed it in the same ancestral population (clade D) than haplogroups 2 (including Type II lineage) and 12 (Lorenzi et al., 2016). The same ancestral origin for Type II and *Chinese 1* deserves attention. Interestingly, Type II strains, which predominate in Europe, are also present in the most western part of Asia (Turkey, Qatar, Iran) and in the Western provinces of China. This suggests a continuum between Type II and *Chinese 1* in the Eurasian continent. Data are lacking regarding genotypes circulating in the central part of Eurasia (Eastern European countries, Russia, Uzbekistan, Kazakhstan, Tajikistan, Northern part of India) to observe the transitional and overlapping areas between *Chinese 1* and Type II. In these transitional areas, recombination phenomena between these 2 main lineages might be found as observed in North America between haplogroup 12 and Type II (Grigg and Sundar, 2009) leading to new genotypes. Another genotype (ToxoDB#20) found in Emirates and Sri Lanka as well as in East Africa (Egypt and Ethiopia) differs from *Chinese 1* by only one PCR-RFLP marker. Although, it has not been included in the phylogenetic studies by Su et al. (2012) and Lorenzi et al. (2016), it probably belongs to the same ancestral clade together with Type II lineage. The evolutionary history of this ancestral clade gathering Type II, *Chinese 1*, and probably ToxoDB#20 could provide an insight on long term migration of *T. gondii*. Three recent studies (Bertranpetit et al., 2016; Lorenzi et al., 2016; Li et al., 2014) that integrate Type II and *Chinese 1* strains presented phylogenetic analyzes supporting the hypothesis of Type II sharing a common ancestor with *Chinese 1*. Li et al. (2016) examined sequence variation in MIC16 gene among *T. gondii* isolates from different hosts and geographical regions. A total of 107 variable

Table 3
Sharing of *T. gondii* genotypes between Asia and other locations.

Genotypes	Number in Asia	Locations in Asia	Other locations (www.toxodb.org)
#1 and #3 (Type II lineage)	30	China, Iran, Turkey, Qatar	Europe Africa: Senegal, Egypt, Mali, Kenya Americas: USA, Brazil, Chile, Costa Rica, Saint Kitts Australia
#2 (Type III)	18	China, Iran, Sri Lanka, Turkey	Europe: mostly South Europe North America: USA Africa: Egypt, Burkina Faso, Congo, Mali South and Central America: Brazil, Argentina, Chile Mexico, Peru, Guyana, Panama, Saint Kitts, Costa Rica Grenada, Nicaragua South America: Colombia, Mexico
#9 (<i>Chinese 1</i>)	187	China, Sri Lanka, Vietnam	North America: USA
#10 (Type I)	71	China, Korea, Malaysia, Myanmar	South America: Brazil, Colombia, Uruguay North America: USA
#17	1	China	South America: Argentina, Brazil, Peru
#18	6	China (Guangdong), Vietnam	Colombia
#20	12	China, United Arab Emirates, Sri Lanka	Egypt, Ethiopia
#89	1	Indonesia	-
#204	1	China	-
#205	4	China	-
#213	2	China	-
#225	3	China	-
<i>Africa 1</i> (MS)	3	Turkey	Africa: Gabon, Cameroon, South America: Brazil (Br I)

nucleotide positions were identified. Their data revealed a clustering of *Chinese 1* and Type II European isolates, that share a common ancestor (bootstrap value of 65 and posterior probability of 0.98). But their work was based on only 3 Type II and 2 *Chinese 1* isolates. In 2017, Bertranpetit et al., presented a phylogeography of a worldwide sample of 168 isolates based on 140 informative single nucleotide polymorphisms where European Type II isolates share a common ancestor with *Chinese 1* isolates. Again, the limited number of informative loci and the small number of Asian isolates included in the study is not sufficient to be definitive. In this last paper, geostatistical analyses for inferring the putative origin of *T. gondii* point to a South American origin for *T. gondii* and suggest that the parasite has initially spread through the Americas and then colonized Asia via the Bering Strait, before entering Europe and Africa through two different and independent migration routes (Bertranpetit et al., 2016). Concerning Asia, these migration pathways of *Toxoplasma* could partially explain the observed East-West genotype gradient (Fig. 2). The migration routes of birds and other intermediate hosts between Asia, Europe and East Africa, which has been suggested to play a role in the propagation of diverse viral and bacterial diseases from Asia to Europe (Jourdain et al., 2007), also support the hypothesis that *Chinese 1* preceded Type II. Among intermediate hosts, rodents, as the main prey of felids, play a major role in the *Toxoplasma* cycle. Rodent migrations could have favored the dispersion of genotypes over the large Eurasian continent. Three rodent species, the house mouse (*Mus musculus*), the black rat (*Rattus rattus*), and the brown rat (*Rattus norvegicus*) are the most successful invasive mammals, having colonized most of the global human habitats (Kosoy et al., 2015). All these species originated from Asia and have started their commensalism with the emergence of agrarian civilizations following their worldwide spread through sea-faring and terrestrial trades. The house mouse originated from western Asia (probably Northern India) and diversified in sub-specific lineages, *M. mus musculus*, *M. m. domesticus*, and *M. mus castaneus* with regional diversification in relation to both range expansion in Eurasia and spread by human transport (Cucchi et al., 2005; Suzuki et al., 2013). *M. m. musculus* entered China from Kazakhstan through the north-west border (Xinjiang) and expansion of its population was dated back to 7150 to 14,300 years ago (Jing et al., 2014). The migration routes of house mice coincide with the colonization routes of modern humans into China, and the expansion times of house mice are consistent with the development of agriculture in southern and northern China (Jing et al., 2014). This species migrated to North Europe whereas the subspecies *M. m. domesticus* was introduced to South and Western Europe, to Middle East and Arabic Peninsula and North Africa (Bonhomme et al., 2007). *M. m. castaneus* appeared to have migrated through a southern route (Yunnan and Guangxi), approximately 4650–9300 years ago (Jing et al., 2014). The rise of agriculture and trade routes also allowed the global range expansion of black rat from Indian subcontinent and/or Southeast Asia to Western Asia, East Africa and Europe, and lastly to the Americas (Aplin et al., 2011). The black rat was reported from the Levant, 1500 BCE (Audouin-Rouzeau and Vigne, 1994). The brown rat was restricted to northern China and Mongolia and began to disperse southward into Southeast Asia and later worldwide with European sea-faring and trades in the last centuries (Puckett et al., 2016).

Human migration and trade exchanges were also proposed to explain a more recent dispersion of *Toxoplasma* genotypes across countries or continents (Lehmann et al., 2006; Mercier et al., 2010). Trade exchange between the Eastern and Western part of Eurasia are ancient: the caravans bringing diverse merchandise together with animals along the well-known Silk Road connected Eastern China with Central Asia, the Near East and the Mediterranean countries for as long as 200 BCE, during the Han dynasty (Boulnois and Mayhew, 2005; Waugh DC, 2010) (Fig. 3). The Silk Road has been proposed as a route via which bacterial or parasitic diseases might have spread between Asia and Europe (Morelli et al., 2010; Jiao, 2010). A maritime coastal road existed since the first century, linking China to diverse harbors in South East

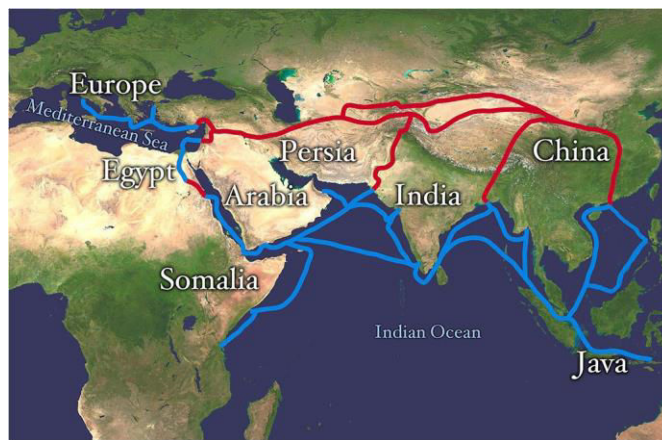


Fig. 3. Maritime (blue) and land (red) Silk Roads between Europe and Asia (https://en.wikipedia.org/wiki/Silk_Road).

Asia, India, Sri Lanka, Iran, Arabic Peninsula, and African horn. New forms of trade exchanges are very active and could perpetuate transmission of *T. gondii* strains between continents. The maritime route could explain the presence of *Chinese 1* in Vietnam (Dubey et al., 2007a), or Sri Lanka (Dubey et al., 2007b). Other examples of strain circulation due to human activities between Old World continents can be encountered: ToxoDB#20 is shared between East Africa (Egypt and Ethiopia) (El Behairy et al., 2013; Dubey et al., 2013), the Emirates and Sri Lanka (Dubey et al., 2007b; Dubey et al., 2010); *Africa 1*, a genotype initially found in Western and Central Africa (Mercier et al., 2010; Ajzenberg et al., 2009) is present in Turkey (Döşkaya et al., 2013), a country known for being a bridge between these continents; the worldwide Type III is present both in South Europe, in Iran, in Turkey and Sri Lanka, but nearly absent in Chinese samples. The island of Sri Lanka is a good example of the diversity of strains that could result from these exchanges: on a relatively small sample of strains (24 strains), 3 Type III, 1 *Chinese 1*, and 9 ToxoDB#20 genotypes were described. The few data available from India are not sufficient to appreciate the part of this large subcontinent in this global pattern. However, the only study that may be considered for this country seems to confirm the presence of Type III and of a large genetic diversity with genotypes showing diverse combinations of Type II and III alleles in patients from the Southern part of India, close to Sri-Lanka (Vijaykumar et al., 2016).

Type I is the second most common genotype among the 418 samples collected in Asian countries. Although it is considered as a main clonal lineage, it is not frequently isolated worldwide (Ajzenberg, 2010). Outside Asia, it is occasionally found, mainly in South America (Shwab et al., 2014). Even if, generally speaking, some reports of Type I genotypes on DNA extracts were suspected to be laboratory contamination due to the large use of RH Type I strain in laboratory as positive control for PCR (Ajzenberg, 2010), this should not be the case when mouse-virulent strains were isolated as in China, Malaysia or Korea (Wang et al., 2013a; Puvanesuaran et al., 2013a, 2013b; Quan et al., 2008). For Malaysian samples, another limitation may be that they were considered as Type I with a genotyping method using only 7 PCR-RFLP markers. The use of other genetic markers may have revealed other non-type I alleles. Among Asian *Toxoplasma* samples, the majority of Type I samples are found in the most Eastern parts of Asia: from the northeast (South Korea, and the Jilin province of China) to the Eastern provinces of China (Jiangsu, Shandong, Fujian, Shanghai) and to South East Asia (Peninsular Malaysia, Myanmar and the neighboring Chinese province of Yunnan). Incomplete genotyping from Japanese and Korean samples confirmed the presence of Type I alleles in strains from Far East Asia (Zakimi et al., 2006; Kyan et al., 2012; Kim et al., 2009; Hong et al., 2014). But, Type I strains were also found among samples from the Tibetan plateau (Qinghai, northwestern Chinese province), showing that

it may be more widely distributed in Asia. Interestingly, a large part of these Type I isolates were encountered in wild animals (33/72) such as bats from Malaysia, Myanmar, Yunnan, Hunan and Jiangxi Chinese provinces or wild boars from the rain forests of Malaysia. From this wild reservoir, it may be transmitted to domestic animals such as free-range ducks in Peninsular Malaysia.

The global genetic diversity is lower than that observed in South America. In South America, 156 different PCR RFLP genotypes (Shwab et al., 2014) were identified among 646 samples whereas in Asia, currently, only 36 different genotypes were encountered in 390 samples. Among the 390 samples, 82.6% (322/390) belong to one of the main clonal lineages (Type I, II, III and Chinese 1). However, a large part of the continent remains underexplored. Apart from China, genotype data are available from only 11 Asian countries. A large diversity of host species in the tropical part of Asia may be associated with a higher genetic diversity as observed in other tropical areas (Mercier et al., 2011). Actually, the largest proportion of atypical strains is found in tropical South Asia (Malaysia, Myanmar, Sri Lanka).

This first global picture of *Toxoplasma* genotypes circulating in Asia allowed to make hypotheses about circulation of strains from Asia to Europe, and to East or North Africa through diverse migration pathways (birds, rodents, felids, human activities), but obviously, more studies are needed from unexplored Asian countries to better understand the genetic population structure of *T. gondii* in this continent. Asia exhibits a large variety of ecological conditions that were demonstrated to play a role in *Toxoplasma* population structure, from wild to rural or urbanized areas, tropical or temperate climate, intermediate and definitive host diversity. It should also be remembered that Asia is considered as the birth place of felids (Johnson et al., 2006), the definitive hosts of *T. gondii*. The ancestors of the felid family and of *T. gondii* were both estimated 11-12 million years ago (Johnson et al., 2006; Su et al., 2003). This should open new research perspectives on the possibility of a common or at least partial co-evolution of *T. gondii* and felines that could have had an impact on genetic diversity as described for a number of host-parasite couples (Hume et al., 2003; Hoberg, 2006; Tanabe et al., 2010).

Role of funding source and conflict of interest

The funding source for Ph.D thesis is supported by Ministry of Science and Technology, government of Thailand. The authors have no conflict of interest related to this publication.

References

Ajzenberg, D., 2010. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future Microbiol* 5, 841-843.

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

Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.L., 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4641-4645.

Al-Kappany, Y.M., Rajendran, C., Abu-Elwafa, S.A., Hilali, M., Su, C., Dubey, J.P., 2010. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. *J. Parasitol.* 96, 1112-1114.

Aplin, K.P., Suzuki, H., Chinen, A.A., Chesser, R.T., Ten Have, J., Donnellan, S.C., Austin, J., Frost, A., Gonzalez, J.P., Herbreteau, V., Catzeflis, F., Soubrier, J., Fang, Y.P., Robins, J., Matisoo-Smith, E., Bastos, A.D.S., Maryanto, I., Sinaga, M.H., Denys, C., Van Den Busche, R.A., Conroy, C., Rowe, K., Cooper, A., 2011. Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of black rats. *PLoS One* 6, e26357.

Audouin-Rouzeau, F., Vigne, J.D., 1994. La colonisation de l'Europe par le Rat noir (*Rattus rattus*). *Rev. Paléobiol.* 13, 125-145.

Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., Mercier, A., Devillard, S., Ajzenberg, D., 2016. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infect. Genet. Evol.* 48, 150-155.

Bonhomme, F., Rivals, E., Orth, A., Grant, G.R., Jeffreys, A.J., Bois, P.R.J., 2007. Species-wide distribution of highly polymorphic minisatellite markers suggests past and present genetic exchanges among house mouse subspecies. *Genome Biol.* 8, R80.

Boulnois, L., Mayhew, B., 2005. Silk Road: Monks, Warriors & Merchants on the Silk Road. *Odyssey*.

Can, H., Döşkaya, M., Ajzenberg, D., Özdemir, H.G., Caner, A., Iz, S.G., Döşkaya, A.D., Atalay, E., Çetinkaya, Ç., Ürgen, S., Karaçalı, S., Ün, C., Dardé, M.L., Gürüz, Y., 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of Izmir, Turkey. *PLoS One* 9, e104930.

Chen, Z.W., Gao, J.M., Huo, X.X., Wang, L., Yu, L., Halm-Lai, F., Xu, Y.H., Song, W.J., Hide, G., Shen, J.L., Lun, Z.R., 2011. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in different geographic regions of China. *Vet. Parasitol.* 183, 166-170.

Chen, R., Lin, X., Hu, L., Chen, X., Tang, Y., Zhang, J., Chen, M., Wang, S., Huang, C., 2015. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from zoo wildlife and pet birds in Fujian, China. *Iran. J. Parasitol.* 10, 663-668.

Cong, W., Huang, S.Y., Zhou, D.H., Zhang, X.X., Zhang, N.Z., Zhao, Q., Zhu, X.Q., 2013. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in house sparrows (*Passer domesticus*) in Lanzhou, China. *Korean J. Parasitol.* 51, 363-367.

Cong, W., Meng, Q.F., Song, H.Q., Zhou, D.H., Huang, S.Y., Qian, A.D., Su, C., Zhu, X.Q., 2014. Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in three species of pet birds in China. *Parasit. Vectors* 7, 152.

Cong, W., Liu, G.H., Meng, Q.F., Dong, W., Qin, S.Y., Zhang, F.K., Zhang, X.Y., Wang, X.Y., Qian, A.D., Zhu, X.Q., 2015. *Toxoplasma gondii* infection in cancer patients: prevalence, risk factors, genotypes and association with clinical diagnosis. *Cancer Lett.* 359, 307-313.

Cong, W., Qin, S.Y., Meng, Q.F., Zou, F.C., Qian, A.D., Zhu, X.Q., 2016. Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in sika deer (*Cervus nippon*) in China. *Infect. Genet. Evol.* 39, 9-11.

Cucchi, T., Vigne, J.D., Auffray, J.C., 2005. First occurrence of the house mouse (*Mus musculus domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943) in the Western Mediterranean: a zooarchaeological revision of subfossil occurrences. *Biol. J. Linn. Soc.* 84, 429-445.

Dardé, M.L., Ajzenberg, D., Su, C., 2014. Chapter 3 - molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma Gondii*, Second edition Academic Press, Boston, pp. 61-97.

Döşkaya, M., Caner, A., Ajzenberg, D., Değirmenci, A., Dardé, M.L., Can, H., Erdoğan, D.D., Korkmaz, M., Uner, A., Güngör, C., Altıntaş, K., Gürüz, Y., 2013. Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol. Int.* 62, 471-474.

Dubey, J.P., Huang, L.T.T., Sundar, N., Su, C., 2007a. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. *Vet. Parasitol.* 146, 347-351.

Dubey, J.P., Rajapakse, R.P.V.J., Wijesundera, R.R.M.K.K., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Kwok, O.C.H., Su, C., 2007b. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Sri Lanka and genetic characterization of the parasite isolates. *Vet. Parasitol.* 146, 341-346.

Dubey, J.P., Zhu, X.Q., Sundar, N., Zhang, H., Kwok, O.C.H., Su, C., 2007c. Genetic and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. *Vet. Parasitol.* 145, 352-356.

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

Dubey, J.P., Pas, A., Rajendran, C., Kwok, O.C.H., Ferreira, L.R., Martins, J., Hebel, C., Hammer, S., Su, C., 2010. Toxoplasmosis in sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the breeding Centre for endangered Arabian wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra wildlife preservation, the State of Qatar. *Vet. Parasitol.* 172, 195-203.

Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Rajendran, C., Yabsley, M.J., Thomas, N.J., Beckmen, K.B., Sennett, D., Ruid, D., Hart, J., Fair, P.A., McFee, W.E., Shearn-Bochsler, V., Kwok, O.C.H., Ferreira, L.R., Choudhary, S., Faria, E.B., Zhou, H., Felix, T.A., Su, C., 2011. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int. J. Parasitol.* 41, 1139-1147.

Dubey, J.P., Choudhary, S., Tilahun, G., Tiao, N., Gebreyes, W.A., Zou, X., Su, C., 2013. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. *Vet. Parasitol.* 196, 206-208.

El Behairy, A.M., Choudhary, S., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Hilali, M., Su, C., Dubey, J.P., 2013. Genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates from stray dogs from Giza, Egypt. *Vet. Parasitol.* 193, 25-29.

Ge, W., Sun, H., Wang, Z., Xu, P., Wang, W., Mu, G., Wei, F., Liu, Q., 2014. Prevalence and genotype of *Toxoplasma gondii* infection in cattle from Jilin Province, northeastern China. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Larchmt. N 14, 399-402.

Grigg, M.E., Sundar, N., 2009. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int. J. Parasitol.* 39, 925-933.

Hoberg, E.P., 2006. Phylogeny of *Taenia*: species definitions and origins of human parasites. *Parasitol. Int.* 55, S23-S30 Suppl.

Hong, S.H., Lee, S.E., Jeong, Y.L., Kim, H.C., Chong, S.T., Klein, T.A., Song, J.W., Gu, S.H., Cho, S.H., Lee, W.J., Howe, D.K., Sibley, L.D., 2014. Prevalence and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* and *Babesia microti* from small mammals captured in Gyeonggi and Gangwon Provinces, Republic of Korea. *Vet. Parasitol.* 205, 512-517.

28. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561-1566.

Hu, Y., Hu, S., Wang, W., Wu, X., Marshall, F.B., Chen, X., Hou, L., Wang, C., 2014. Earliest evidence for commensal processes of cat domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 116-120.

Huang, S.Y., Cong, W., Zhou, P., Zhou, D.H., Wu, S.M., Xu, M.J., Zou, F.C., Song, H.Q., Zhu, X.Q., 2012. First report of genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from wild birds in China. *J. Parasitol.* 98, 681-682.

- Hume, J.C.C., Lyons, E.J., Day, K.P., 2003. Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 19, 144-149.
- Jiang, H.H., Huang, S.Y., Zhou, D.H., Zhang, X.X., Su, C., Deng, S.Z., Zhu, X.Q., 2013. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from pigs from different localities in China by PCR-RFLP. *Parasit. Vectors* 6, 227.
- Jiang, H.H., Qin, S.Y., Wang, W., He, B., Hu, T.S., Wu, J.M., Fan, Q.S., Tu, C.C., Liu, Q., Zhu, X.Q., 2014. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in bats in southern China. *Vet. Parasitol.* 203, 318-321.
- Jiao, L., 2010. Unprecedented excavation brings Maritime Silk Road to life. *Science* 328, 424-425.
- Jing, Y., 2008. The origins and development of animal domestication in China. *Chin. Archaeol.* 8, 1-7.
- Jing, M., Yu, H.T., Bi, X., Lai, Y.C., Jiang, W., Huang, L., 2014. Phylogeography of Chinese house mice (*Mus musculus musculus/castaneus*): distribution, routes of colonization and geographic regions of hybridization. *Mol. Ecol.* 23, 4387-4405.
- Johnson, W.E., Eizirik, E., Pecon-Slattery, J., Murphy, W.J., Antunes, A., Teeling, E., O'Brien, S.J., 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* 311, 73-77.
- Jourdain, E., Gauthier-Clerc, M., Bicot, D., Sabatier, P., 2007. Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into Western Mediterranean wetlands. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 365-372.
- Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14872-14877.
- Khan, A., Dubey, J.P., Su, C., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.* 41, 645-655.
- Kim, H.Y., Kim, Y.A., Lee, H.S., Rhie, H.G., Cho, S.H., Yu, J.R., Lee, S.E., 2009. Genotype of *Toxoplasma gondii* from blood of stray cats in Gyeonggi-do, Korea. *Korean J. Parasitol.* 47, 413-415.
- Kosoy, M., Khlyap, L., Cosson, J.F., Morand, S., 2015. Aboriginal and invasive rats of genus *Rattus* as hosts of infectious agents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15, 3-12.
- Kyan, H., Taira, M., Yamamoto, A., Inaba, C., Zakimi, S., 2012. Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* genotypes from goats at an abattoir in Okinawa. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65, 167-170.
- Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P., 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11423-11428.
- Li, M., Mo, X.W., Wang, L., Chen, H., Luo, Q.L., Wen, H.Q., Wei, W., Zhang, A.M., Du, J., Lu, F.L., Lun, Z.R., Shen, J.L., 2014. Phylogeny and virulence divergence analyses of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasit. Vectors* 7, 133.
- Li, Y.N., Nie, X., Peng, Q.Y., Mu, X.Q., Zhang, M., Tian, M.Y., Min, S., 2015. Seroprevalence and genotype of *Toxoplasma gondii* in pigs, dogs and cats from Guizhou province, Southwest China. *Parasit. Vectors* 8, 214.
- Lin, A., Shin, E.H., Kim, T.Y., Park, J.H., Guk, S.M., Chai, J.Y., 2005. Genetic characteristics of the Korean isolate KI-1 of *Toxoplasma gondii*. *Korean J. Parasitol.* 43 (1), 27-32.
- Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M.S., Namasivayam, S., Swapna, L.S., Hadjithomas, M., Karameycheva, S., Pinney, D., Brunk, B.P., Ajioka, J.W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J.C., Boyle, J.P., Dardé, M.L., Diaz-Miranda, M.A., Dubey, J.P., Fritz, H.M., Gennari, S.M., Gregory, B.D., Kim, K., Saeji, J.P.J., Su, C., White, M.W., Zhu, X.Q., Howe, D.K., Rosenthal, B.M., Grigg, M.E., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J.C., Roos, D.S., Sibley, L.D., 2016. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat. Commun.* 7, 10147.
- Ma, H., Wang, Z., Wang, C., Li, C., Wei, F., Liu, Q., 2015. Fatal *Toxoplasma gondii* infection in the giant panda. *Parasite* 22, 30.
- Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A.L., Durand, P., Salle, B., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e876.
- Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M.P., de Thoisy, B., Bonnabau, H., Collinet, F., Boukhari, R., Blanchet, D., Simon, S., Carme, B., Dardé, M.L., 2011. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1378-1387.
- Miao, Q., Huang, S.Y., Qin, S.Y., Yu, X., Yang, Y., Yang, J.F., Zhu, X.Q., Zou, F.C., 2015. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Yunnan black goats (*Capra hircus*) in south-west China by PCR-RFLP. *Parasit. Vectors* 8, 57.
- Morelli, G., Song, Y., Mazzoni, C.J., Eppinger, M., Roumagnac, P., Wagner, D.M., Feldkamp, M., Kusecek, B., Vogler, A.J., Li, Y., Cui, Y., Thomson, N.R., Jombart, T., Leblois, R., Lichtner, P., Rahalison, L., Petersen, J.M., Balloux, F., Keim, P., Wirth, T., Ravel, J., Yang, R., Carniel, E., Achtman, M., 2010. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 42, 1140-1143.
- Puckett, E.E., Park, J., Combs, M., Blum, M.J., Bryant, J.E., Caccone, A., Costa, F., Deinum, E.E., Esther, A., Himsworth, C.G., Keightley, P.D., Ko, A., Lundkvist, Å., McElhinney, L.M., Morand, S., Robins, J., Russell, J., Strand, T.M., Suarez, O., Yon, L., Munshi-South, J., 2016. Global population divergence and admixture of the brown rat (*Rattus norvegicus*). *Proc. Biol. Sci.* 283.
- Puvanuesaran, V.R., Noordin, R., Balakrishnan, V., 2013a. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from wild boars in Peninsular Malaysia. *PLoS One* 8, e61730.
- Puvanuesaran, V.R., Noordin, R., Balakrishnan, V., 2013b. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-range ducks in Malaysia. *Avian Dis.* 57, 128-132.
- Qian, W., Wang, H., Su, C., Shan, D., Cui, X., Yang, N., Lv, C., Liu, Q., 2012. Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* strains from stray cats revealed a single genotype in Beijing, China. *Vet. Parasitol.* 187, 408-413.
- Qian, W.F., Yan, W.C., Wang, T.Q., Zhai, K., Han, L.F., Lv, C.C., 2015. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in pet dogs in Central China. *Korean J. Parasitol.* 53, 125-128.
- Qin, S.Y., Cong, W., Liu, Y., Li, N., Wang, Z.D., Zhang, F.K., Huang, S.Y., Zhu, X.Q., Liu, Q., 2014. Molecular detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in bats in four provinces of China. *Parasit. Vectors* 7, 558.
- Qin, S.Y., Zhou, D.H., Cong, W., Zhang, X.X., Lou, Z.L., Yin, M.Y., Tan, Q.D., Zhu, X.Q., 2015. Seroprevalence, risk factors and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in free-range white yaks (*Bos grunniens*) in China. *Vet. Parasitol.* 211, 300-302.
- Quan, J.H., Kim, T.Y., Choi, I.U., Lee, Y.H., 2008. Genotyping of a Korean isolate of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP and microsatellite analysis. *Korean J. Parasitol.* 46, 105-108.
- Rong, G., Zhou, H.L., Hou, G.Y., Zhao, J.M., Xu, T.S., Guan, S., 2014. Seroprevalence, risk factors and genotyping of *Toxoplasma gondii* in domestic geese (*Anser domestica*) in tropical China. *Parasit. Vectors* 7, 459.
- Shwab, E.K., Zhu, X.Q., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453-461.
- Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., Sibley, L.D., 2003. Recent expansion of *Toxoplasma gondii* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 414-416.
- Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 36, 841-848.
- Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1-11.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Zhu, X.Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5844-5849.
- Sun, H., Wang, Y., Zhang, Y., Ge, W., Zhang, F., He, B., Li, Z., Fan, Q., Wang, W., Tu, C., Li, J., Liu, Q., 2013. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in bats in Myanmar. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3526-3528.
- Suzuki, H., Nunome, M., Kinoshita, G., Aplin, K.P., Vogel, P., Kryukov, A.P., Jin, M.L., Han, S.H., Maryanto, I., Tsuchiya, K., Ikeda, H., Shiroishi, T., Yonekawa, H., Moriwaki, K., 2013. Evolutionary and dispersal history of Eurasian house mice *Mus musculus clarifed* by more extensive geographic sampling of mitochondrial DNA. *Heredity* 111, 375-390.
- Tanabe, K., Mita, T., Jombart, T., Eriksson, A., Horibe, S., Palacpac, N., Ranford-Cartwright, L., Sawai, H., Sakihama, N., Ohmae, H., Nakamura, M., Ferreira, M.U., Escalante, A.A., Prugnolle, F., Björkman, A., Färnert, A., Kaneko, A., Horii, T., Manica, A., Kishino, H., Balloux, F., 2010. *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. *Curr. Biol.* 20, 1283-1289.
- Tian, Y.M., Huang, S.Y., Miao, Q., Jiang, H.H., Yang, J.F., Su, C., Zhu, X.Q., Zou, F.C., 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from cats in Yunnan Province, Southwest China. *Parasit. Vectors* 7, 178.
- Vijaykumar, B.R., Lekshmi, S.U., Sai Kant, R., Vaigundan, D., Mahadevan, A., Rajendran, C., Shankar, S.K., Jayshree, R.S., 2016. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from autopsy proven cases of AIDS associated cerebral toxoplasmosis in South India. *Infect. Genet. Evol.* 39, 106-112.
- Wang, H., Wang, T., Luo, Q., Huo, X., Wang, L., Liu, T., Xu, X., Wang, Y., Lu, F., Lun, Z., Yu, L., Shen, J., 2012. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 393-397.
- Wang, L., Chen, H., Liu, D., Huo, X., Gao, J., Song, X., Xu, X., Huang, K., Liu, W., Wang, Y., Lu, F., Lun, Z., Luo, Q., Wang, X., Shen, J., 2013a. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China. *PLoS One* 8, e53483.
- Wang, L., Cheng, H.W., Huang, K.Q., Xu, Y.H., Li, Y.N., Du, J., Yu, L., Luo, Q.L., Wei, W., Jiang, L., Shen, J.L., 2013b. *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity. *Parasit. Vectors* 6, 273.
- Wang, L., He, L., Meng, D., Chen, Z., Wen, H., Fang, G., Luo, Q., Huang, K., Shen, J., 2015. Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in cancer patients in Anhui Province, Eastern China. *Parasit. Vectors* 8, 162.
- Wang, D., Liu, Y., Jiang, T., Zhang, G., Yuan, G., He, J., Su, C., Yang, N., 2016. Seroprevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs intended for human consumption in Liaoning province, northeastern China. *Parasit. Vectors* 9, 248.
- Wang, D.C., 2010. The Silk Roads in History. 52 (3):9-22 Available from: <https://www.penn.museum/documents/publications/expedition/PDFs>.
- Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39, 895-901.
- Yan, C., Liang, L.J., Zhang, B.B., Lou, Z.L., Zhang, H.F., Shen, X., Wu, Y.Q., Wang, Z.M., Tang, R.X., Fu, L.L., Zheng, K.Y., 2014. Prevalence and genotyping of *Toxoplasma gondii* in naturally-infected synanthropic rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*) in eastern China. *Parasit. Vectors* 7, 591.
- Yang, Y., Ying, Y., Verma, S.K., Cassinelli, A.B.M., Kwok, O.C.H., Liang, H., Pradhan, A.K., Zhu, X.Q., Su, C., Dubey, J.P., 2015. Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China. *Vet. Parasitol.* 211, 283-288.
- Zakimi, S., Kyan, H., Oshiro, M., Sugimoto, C., Xuenan, X., Fujisaki, K., 2006. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 68, 1105-1107.
- Zhang, X.X., Lou, Z.Z., Huang, S.Y., Zhou, D.H., Jia, W.Z., Su, C., Zhu, X.Q., 2013. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Qinghai vole, Plateau pika and Tibetan ground-tit on the Qinghai-Tibet Plateau, China. *Parasit. Vectors* 6, 291.
- Zhang, X.X., Huang, S.Y., Zhang, Y.G., Zhang, Y., Zhu, X.Q., Liu, Q., 2014. First report of genotyping of *Toxoplasma gondii* in free-living *Microtus fortis* in northeastern China. *J. Parasitol.* 100, 692-694.
- Zhang, F.K., Wang, H.J., Qin, S.Y., Wang, Z.D., Lou, Z.L., Zhu, X.Q., Liu, Q., 2015. Molecular detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in wild waterfowls in Jilin Province, Northeastern China. *Parasitol. Int.* 64, 576-578.
- Zhang, X.X., Cong, W., Ma, J.G., Lou, Z.L., Zhao, Q., Meng, Q.F., Qian, A.D., Zhu, X.Q., 2016. First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in China. *Infect. Genet. Evol.* 44, 127-129.
- Zhou, P., Zhang, H., Lin, R.Q., Zhang, D.L., Song, H.Q., Su, C., Zhu, X.Q., 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitol. Int.* 58, 193-195.
- Zhou, P., Nie, H., Zhang, L.X., Wang, H.Y., Yin, C.C., Su, C., Zhu, X.Q., Zhao, J.L., 2010. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in China. *J. Parasitol.* 96, 1027-1029.

- Zhou, Y., Zhang, H., Cao, J., Gong, H., Zhou, J., 2013. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from domestic rabbits in China to reveal the prevalence of type III strains. *Vet. Parasitol.* 193, 270-276.
- Zia-Ali, N., Fazaeli, A., Khoramizadeh, M., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Keshavarz-Valian, H., 2007. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. *Parasitol. Res.* 101, 111-115.

Annexe 4. Article 5

Brouat C, Diagne CA, Ismaïl K, Aroussi A, Dalecky A, Bâ K, Kane M, Niang Y, Diallo M, Sow A, **Galal L**, Piry S, Dardé ML, Mercier A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in commensal rodents sampled across Senegal, West Africa. *Parasite*. 2018;25:32.

Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in commensal rodents sampled across Senegal, West Africa

Carine Brouat^{1,*}, Christophe Amidi Diagne^{1,2}, Khadija Ismaïl³, Abdelkrim Aroussi³, Ambroise Dalecky⁴, Khalilou Bâ², Mamadou Kane², Youssoupha Niang², Mamoudou Diallo², Aliou Sow², Lokman Galal³, Sylvain Piry¹, Marie-Laure Dardé³, and Aurélien Mercier³

¹ CBGP, IRD, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Univ. Montpellier, 755 avenue du campus Agropolis, 34988 Montpellier-sur-Lez cedex, France

² BIOPASS, CBGP-IRD, ISRA, UCAD, Campus de Bel-Air, BP 1386, Dakar CP 18524, Senegal

³ UMR-S 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, INSERM, Univ. Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France

⁴ LPED, IRD, Aix Marseille Univ., Centre St Charles, case 10, 3 place Victor Hugo, CS 80249, 13331 Marseille cedex 03, France

Received 6 February 2018, Accepted 20 June 2018, Published online 16 July 2018

Abstract – Risks related to *Toxoplasma gondii* infection in humans remain poorly known in Senegal. Although rodent surveys could help to assess the circulation of *T. gondii*, they have seldom been set up in sub-Saharan Africa. The aim of this study was to examine *Toxoplasma* seroprevalence in rodents from villages and towns across Senegal. Rodents were sampled in 40 localities using a standardised trapping protocol. Detection of *T. gondii* antibodies was performed on 1205 rodents, using a modified agglutination test (MAT) technique. Seroprevalence data were analysed depending on geography, the local rodent community, and individual characteristics of the rodent hosts. We found 44 seropositive rodents from four different species (*Mastomys erythroleucus*, *Mastomys natalensis*, *Mus musculus domesticus*, *Rattus rattus*). *Toxoplasma* seroprevalence was low, averaging 4% in the localities. Higher *Toxoplasma* seroprevalence (up to 24%) was found in northern Senegal, a region known to be the heart of pastoral herding in the country.

Key words: Africa, rodents, Senegal, seroprevalence, *Toxoplasma gondii*.

Résumé – Séroprévalence de *Toxoplasma gondii* chez les rongeurs commensaux au Sénégal, Afrique de l’Ouest. Les risques liés à l’infection par *Toxoplasma gondii* chez l’homme restent mal connus au Sénégal. Bien que les rongeurs soient considérés comme des marqueurs pertinents de la circulation de *T. gondii*, peu d’études ont ciblé ces hôtes en Afrique subsaharienne. Le but de cette étude était d’étudier la séroprévalence de *Toxoplasma* chez les rongeurs des villes et des villages du Sénégal. Les rongeurs ont été échantillonnés dans 40 localités avec un protocole de piégeage standardisé. La détection des anticorps contre *T. gondii* a été faite sur 1205 rongeurs avec un test d’agglutination modifié. Les données de séroprévalence ont été analysées en fonction de la géographie, de la communauté locale de rongeurs et de caractéristiques individuelles du rongeur. Nous avons trouvé 44 individus séropositifs, de quatre espèces différentes (*Mastomys erythroleucus*, *Mastomys natalensis*, *Mus musculus domesticus*, *Rattus rattus*). La séroprévalence moyenne est faible, de l’ordre de 4 % au sein des localités. Les plus fortes séroprévalences (jusqu’à 24 %) ont été observées dans le Nord du Sénégal, une région connue pour être le cœur de l’élevage pastoral dans le pays.

Chapitre VI. Introduction

Toxoplasma gondii [25] is an intracellular pathogen with a worldwide distribution [17]. In humans, infections range in severity from asymptomatic to lethal, and are particularly dangerous to the unborn child during pregnancy and to

immunosuppressed patients. Transmission to humans may occur either congenitally, or by ingestion of undercooked meat containing tissue cysts, or of food and water contaminated with oocysts shed into the environment in the faeces of felids. Although felids are the only known definitive host of *T. gondii*, all homeothermic animals may act as intermediate hosts [33]. Rodents constitute important prey for domestic felids, and are among the few wild mammals to persist in villages and towns.

*Corresponding author: carine.brouat@ird.fr

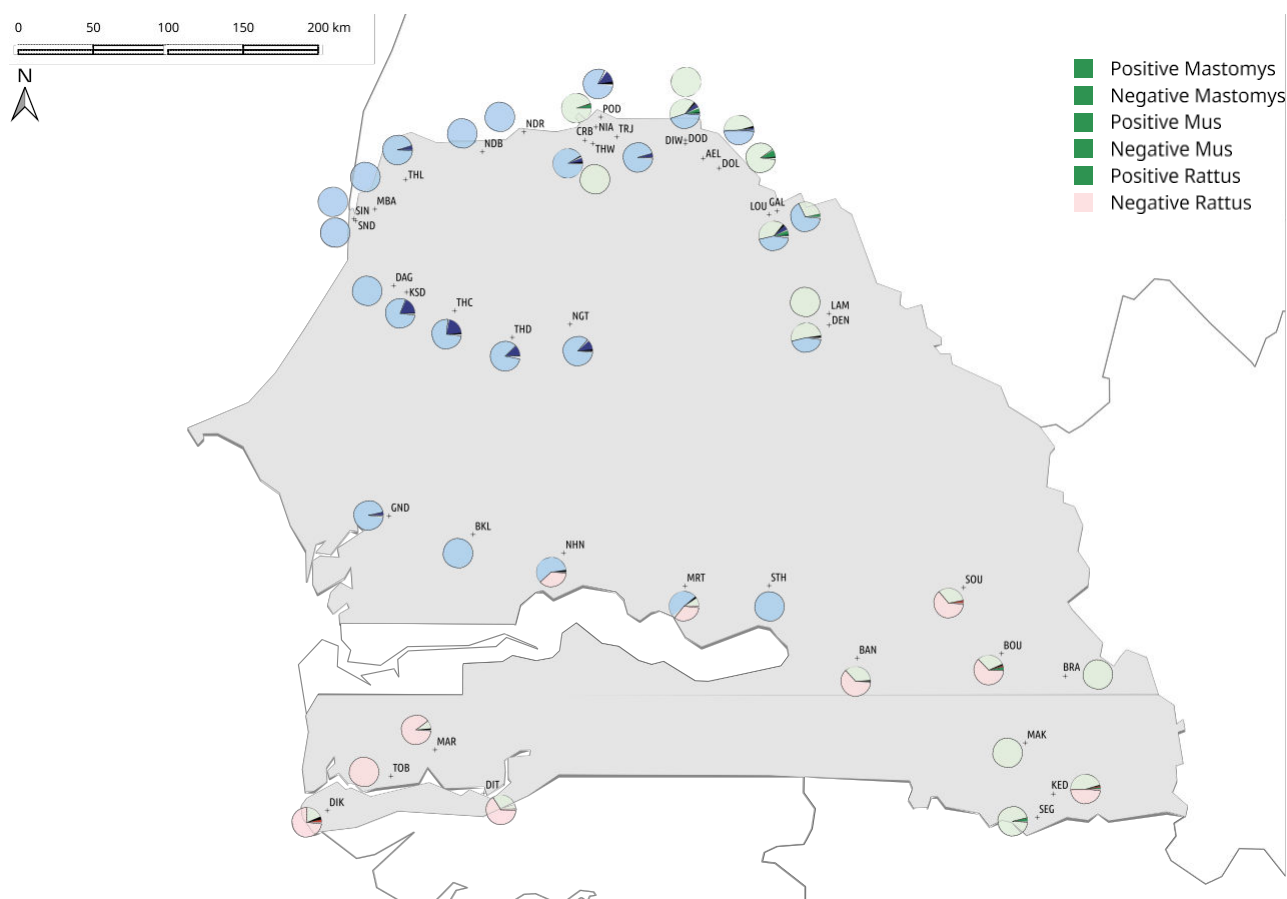


Fig. 1. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in rodent communities in villages and towns in Senegal. See Table 1 for locality codes. Light and dark colours indicated the percentage of negative (-) and positive (+) rodents of each dominant species in the community (*Mus musculus*, *Rattus rattus* or *Mastomys* spp.), respectively.

For this reason, they are often considered relevant markers to assess the circulation of *T. gondii* in commensal habitats [23, 30].

In sub-Saharan Africa, human seroprevalence is highly variable, with reported values ranging from 4% to 83% [20]. In Senegal, *T. gondii* infection in humans has been found to vary between 4% and 40% [19, 24]. However, most studies concerned the city of Dakar and the distribution of risks related to the disease across the country remains largely unknown. Moreover, the seroprevalence of *Toxoplasma* in animal populations has rarely been characterised in Senegal [8, 12].

In this study, we provide serological data for *T. gondii* obtained from 1205 rodents sampled in villages and towns in Senegal. Seroprevalence data were analysed regarding the geographical location of the sampling locality, its rodent community, and the individual characteristics of the rodent hosts.

Chapitre VII. Material and methods

Sampling

Fieldwork was conducted in 40 localities in Senegal between 2011 and 2014 (Fig. 1, Table 1). Trapping within private properties was performed with prior agreement from local authorities. All animal-related procedures were carried out

under our laboratory authorisation for experiments on wild animals (No. D 34-169-1), and followed the official guidelines of the American Society of Mammalogists [31]. The detailed description of the standardised trapping protocol used here was provided in [7]. Rodents were captured alive and euthanised using cervical dislocation, weighed to the nearest 0.5 g, sexed and dissected. Intra-cardiac blood was sampled immediately after death and spotted onto Whatman No. 3 papers that were air-dried and then stored in a plastic bag at room temperature (RT) in the field and then at 4 °C in the laboratory.

Rodents were identified to the species level using morphologic tools [14]. The rodent community was characterised at each locality using trap success (e.g., the ratio between the number of captured rodents and active traps set), as a proxy for relative rodent abundance, and Simpson's diversity index [32].

Dried blood samples were used for the detection of *T. gondii* antibodies using a modified agglutination test (MAT) technique [9] adapted for dried blood samples, with a cut-off titre at 1:16 [20]. Two 5 mm diameter dried blood spots were punched out of each blotting paper circle and placed into the well of a flat-bottomed microtitre plate. The blood was eluted out in 80 μ L of phosphate buffered saline, pH 7.2 (bioMérieux). Plates were covered and left to elute overnight

Table 1. Rodent sampling in Senegal, number of seropositive individuals for *Toxoplasma gondii*, and mean seroprevalence per locality and rodent species.

Locality	Code	Long.	Lat.	N ^a	N _{sero} ^b	SP ^c (%)	S ^d	T _s ^e	Rodent species ^f							
									A. <i>niloticus</i>	M. <i>erythroleucus</i>	M. <i>natalensis</i>	P. <i>daltoni</i>	M. m. <i>domesticus</i>	R. <i>rattus</i>		
Aere Lao	AEL	-14.32														
Badi Nieriko	BAN	-13.38														
Boutougoufara	BOU	-12.49														
Bransan	BRA	-12.10														
Croisement Boube	CRB	-15.06														
Dagathie	DAG	-16.25														
Dendoudi	DEN	-13.54														
Diakene-Wolof	DIK	-16.64														
Diattacounda	DIT	-15.68														
Diomandou Walo	DIW	-14.43														
Dodel	DOD	-14.43														
Doumnga Lao	DOL	-14.22														
Galoya	GAL	-13.86														
Gandiaye	GND	-16.27														
Kedougou	KED	-12.18														
Keur Seyni Dieng	KSD	-16.17														
Lambago	LAM	-13.54														
Lougue	LOU	-13.91														
Mako	MAK	-12.35														
Marsassoum	MAR	-15.98														
Mbakhana	MBA	-16.37														
Mbirkilane	BKL	-15.75														
Mereto	MRT	-14.44														
Ndiareme	NDR	-15.44														
Ndombo	NDB	-15.70														
Nguith	NGT	-15.15														
Niahene	NHN	-15.19														
Niandane	NIA	-14.99														
Podor	POD	-14.96														
Segou	SEG	-12.28														
Sinthiou Maleme	STH	-13.92														
Soutouta	SOU	-12.72														
Saint-Louis Ile Nord	SIN	-16.50														
Saint-Louis Sor	SND	-16.49														
Taredji	TRJ	-14.86														
Thiamene Cayor	THC	-15.87														
Thiamene Djolof	THD	-15.51														
Thiewle	THW	-15.01														
Thilène	THL	-16.18														
Tobor	TOB	-16.25														
Total				1604	1205				39\23\0	376\292\13	137\107\2	25\18\0	689\516\25	334\249\4		
Mean seroprevalence (%)						4.2			0.0	4.5	1.9	0	4.8	1.6		

^a Number of sampled rodents;^b Number of rodents considered for serological analyses;^c Seroprevalence of *T. gondii*;^d Simpson's diversity index;^e Trap success, calculated as the ratio between the number of rodents sampled and the number of traps set in the houses, minus non-active traps (e.g., those found closed and empty, or those having captured small mammals other than rodents);^f Number of individuals sampled/Number of individuals serotyped/Number of seropositive individuals.

at RT and at 400 rpm agitation. Ten microlitres of each eluted sample were used. Samples were screened at four serial dilutions (1:16, 1:32, 1:320 and 1:640). For serological control, fresh blood from *T. gondii* antibody-seronegative Swiss mice (not infected by *T. gondii*) and *T. gondii* antibody-seropositive Swiss mice (experimentally infected with control of the presence of cysts in the brain) (*Mus musculus*, Janvier Labs, Saint-Berthevin, France) was spotted onto a 5 mm diameter circle on Whatman No. 3 paper and allowed to dry at RT for 24 h, before storage at RT in sealed bags. Antibody titres were determined by the last dilution where the agglutination pattern could be read in comparison with the negative and positive controls. *Toxoplasma* seroprevalence was finally calculated as the percentage of seropositive rodents in each sampling locality.

Statistical analyses

We carried out a generalised linear model (GLM) assuming a binomial distribution to test whether individual rodent seropositivity was related to geography (described by latitude and longitude coordinates of the sampled individual), rodent community diversity (Simpson index) and relative abundance (estimated using trap success) at the locality of sampling, as well as rodent species, sex and body mass (this variable was centred-reduced to avoid the confounding effect of specific differences). The interactions between rodent species and geographical coordinates were also considered in the model. Using the Akaike information criterion with correction for samples of finite size (AICc), we carried out model selection from the full starting model. We then chose the most parsimonious model among those selected within two AIC units of the best model obtained. *P* values were obtained by stepwise model simplification using likelihood-ratio tests and were considered significant when $p < 0.05$. The final model was validated by the graphical checking of normality, independence and variance homogeneity of the residuals. All analyses were performed with R Software using the lme4 v1.1-8 [4] and MuMIn v1.15.1 [3] packages.

Chapitre VIII. Results

A total of 1604 rodents were sampled (mean trap success: 0.30 ± 0.11): 689 house mice (*Mus musculus domesticus*), 513 multimammate rats (376 *Mastomys erythroleucus* and 137 *M. natalensis*), 334 black rats (*Rattus rattus*), 39 Nile rats (*Arvicanthis niloticus*), 25 Dalton's mice (*Praomys daltoni*), three brown rats (*Rattus norvegicus*) and one fat mouse (*Steatomys* sp.) (Table 1). Rodent diversity was relatively low within localities (mean Simpson's diversity index: 0.78 ± 0.21) (Table 1).

A total of 1205 rodents (*Mastomys* spp., *R. rattus*, *M. m. domesticus*, *A. niloticus* and *P. daltoni*) were screened for *Toxoplasma* antibodies. Among them, we found 44 seropositive rodents (Table 1). MAT titres were: 1:16 in nine, 1:32 in 28, and above 1:320 in seven. The 44 seropositive rodents belonged to four different species: the native *M. erythroleucus* ($n = 13$; 4% of the screened individuals) and *M. natalensis* ($n = 2$; 2%), and the invasive *M. m. domesticus* ($n = 25$;

5%), and *R. rattus* ($n = 4$; 2%). No seropositive individuals were found among *A. niloticus* and *P. daltoni*, represented by very low sample sizes ($n = 23$ and $n = 18$, respectively). Within localities, *Toxoplasma* seroprevalence (mean: 0.04 ± 0.06) ranged from zero (20 localities) to 24% (code THC) (Fig. 1; Table 1).

Statistical analysis was restricted to data for the four species with sufficient sample sizes (i.e., *M. m. domesticus*, *R. rattus* and *Mastomys* species). Rodent seropositivity was significantly related to latitude (Likelihood Ratio Test $LRT_{1,1164} = 7.91$ $p = 0.0049$), with higher seroprevalence in northern localities (Fig. 1), but not with longitude ($LRT_{1,1164} = 0.57$, $p = 0.4520$), Simpson diversity ($LRT_{1,1164} = 0.01$, $p = 0.9346$), trap success ($LRT_{1,1164} = 0.22$, $p = 0.6423$), rodent species ($LRT_{3,1164} = 0.96$, $p = 0.8103$), sex ($LRT_{1,1164} = 0.64$, $p = 0.4254$) or body mass ($LRT_{1,1164} = 0.64$, $p = 0.4254$).

Chapitre IX. Discussion

In Senegal, commensal rodent communities are dominated by native *Mastomys* spp., as well as by the invasive *M. m. domesticus* from the centre to the north of the country, or by *R. rattus* in the southern part [7] (Fig. 1). The distribution of the various species reflects the ongoing eastwards spread of invasive rodents from coastal localities where they were introduced during the colonial era [7, 15, 18].

Mean *Toxoplasma* seroprevalence was relatively low (4%) in rodents from Senegal. This value closely matches that found in rodents elsewhere [2, 13, 19, 20, 22]. Low seroprevalence in rodents led to an initial question on the sensitivity of the serological test used to detect *T. gondii* infection. The MAT technique is commonly used in diverse species of animals. It was shown to be a reliable indicator of infection in mice of several laboratory strains [11, 26]. Seronegative values were nevertheless reported in *Mus musculus* offspring infected by vertical transmission from chronically infected dams, although the infection was confirmed by PCR [5, 27]. Diverse virulence of a given *T. gondii* strain has been observed in laboratory and wild mouse strains, indicating different innate immunological reactions linked to polymorphic variations in the IRG system [16, 21]. Also, differences in antibody response against *T. gondii* infection among wild rodent species cannot be excluded. All these elements point out the benefit of combining different techniques of *Toxoplasma* detection in future studies, in order to evaluate their respective value for the screening of rodent communities in the wild.

Low *Toxoplasma* seroprevalence is expected under Sahelian climatic conditions (low hygrometry, high soil and air temperatures and ultraviolet irradiation levels), which are poorly suitable for oocysts survival and sporulation [10] and may decrease the probability of environmental contamination [33]. On the basis of this assumption, mean seroprevalence was found to be similarly low in this study and in the only other rodent survey performed in the Sahel (e.g., in Niamey, Niger: <2% *Toxoplasma* seroprevalence in *M. m. domesticus*, *R. rattus* and *M. natalensis*) [20]. Nevertheless, climatic conditions cannot explain the latitudinal gradient found in Senegal.

Indeed, in this country the main climatic factor related to latitude is aridity, which would be unfavourable to *Toxoplasma* transmission but increases from south to north [29] like the number of positive rodents. This unexpected latitudinal pattern suggests the effect of environmental factors other than climate on *Toxoplasma* seroprevalence in rodents. For instance, the proximity of irrigated surfaces may play a role, as indicated by higher *Toxoplasma* seroprevalence found in rodents that were sampled within irrigated gardens in Niamey [20]. Seroprevalence values in rodents may also reflect differences in the distribution of other host species such as cats, dogs and livestock, which were found to be largely infected by *Toxoplasma* in Senegal [8, 12, 28]. For instance, the higher number of positive rodents in the North could relate to the large livestock populations of the Ferlo region, which is the heart of pastoral herding in Senegal [6]. Large populations of domestic cats have been observed in villages in the Senegal River's middle valley (Duplantier, unpublished data), but there are unfortunately no data on the distribution of domestic and wild felids across the country that could help to explain the differences in *Toxoplasma* seroprevalence found in rodents among the different localities [8].

Variations in *T. gondii* infection were not related to variations in rodent communities among localities (Fig. 1). We would have expected to detect higher seroprevalence values in some species than in others because of differences in body size and home range size (e.g., *R. rattus* larger than *M. m. domesticus*), or in some individuals because of sex or body mass (e.g., [1, 30]). However, low seroprevalence levels lead to low statistical power to detect the effect of such factors in complex models. Because of their shorter life expectancy and smaller home-range, rodents may be less likely to be infected than larger mammals [1], which raises the question of their role as sentinels for *T. gondii* infection. The specific ecological characteristics of the rodents sampled in this study could also explain the low seroprevalence. Indeed, *R. rattus* (that often build nests in the roofs of houses), or *M. m. musculus* and *Mastomys* species (that use crevices or cracks as burrows) are less at risk of being infected by *T. gondii* than fossorial mammals, because they are less in contact with potentially contaminated soil [1].

To our knowledge, this study is the first to focus on *Toxoplasma* seroprevalence in rodents at the scale of a Sahelian country. To obtain a clearer view of *T. gondii* epidemiology, similar studies in rural areas on other epidemiological agents such as cats, sheep and goats, are necessary. They will enable us to better understand the risk factors related to *T. gondii* in villages and towns of Senegal, which seem to be variable geographically.

Chapitre X. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Jean-Marc Duplantier for his precious help and advice during this work, and all the Senegalese people who allowed us to trap rodents in their homes. Funding was provided by the *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD) and the ANR ENEMI (ANR-11-JSV7-0006).

Chapitre XI. References

- Afonso E, Thulliez P, Pontier D, Gilot-Fromont E. 2007. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitology*, 134, 1963–1971.
- Araujo JB, da Silva AV, Rosa RC, Mattei RJ, da Silva RC, Richini-Pereira VB, Langoni H. 2010. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 174, 328–331.
- Bartoń K. 2013. MuMIn: multi-model inference. Available from: <http://r-forge.r-project.org/projects/mumin/>.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–47.
- Beverley JK. 1959. Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. *Nature*, 183, 1348–1349.
- Cesaro J-D, Magrin C, Ninot O. 2010. Atlas de l'élevage au Sénégal. Cirad, Prodig, ATP Icare: Paris.
- Dalecky A, Bâ K, Piry S, Lippens C, Diagne CA, Kane M, Sow A, Diallo M, Niang Y, Konecny A, Sarr N, Artige E, Charbonnel N, Granjon L, Duplantier JM, Brouat C. 2015. Range expansion of the invasive house mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: a synthesis of trapping data over three decades, 1983–2014. *Mammal Review*, 45, 176–190.
- Davoust B, Mediannikov O, Roqueplo C, Perret C, Demoncheaux J-P, Sambou M, Guillot J, Blaga R. 2014. Enquête de séroprévalence de la toxoplasmose animale au Sénégal. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 108, 73–77.
- Desmonts G, Remington JS. 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 562–568.
- Dubey JP. 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *Journal of Parasitology*, 84, 862–865.
- Dubey JP, Thulliez P, Powell EC. 1995. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *Journal of Parasitology*, 81, 48–53.
- Garin J-P, Baylet R, Despeignes J, Kien Tuong T, Rioche M, Correa P. 1971. Recherches épidémiologiques sur la toxoplasmose humaine et animale au Sénégal. *Médecine d'Afrique Noire*, 18, 751–753.
- Gotteland C, Chaval Y, Villena I, Galan M, Geers R, Aubert D, Poulle ML, Charbonnel N, Gilot-Fromont E. 2013. Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology*, 141, 259–268.
- Granjon L, Duplantier JM. 2009. Les rongeurs de l'Afrique sahélo-soudanaïenne. *Faune et Flore Tropicales*. IRD Editions/Publications scientifiques du Muséum: Marseille, France.
- Konečný A, Estoup A, Duplantier JM, Bryja J, Bâ K, Galan M, Tatar C, Cosson J-F. 2013. Invasion genetics of the introduced black rat (*Rattus rattus*) in Senegal, West Africa. *Molecular Ecology*, 22, 286–300.
- Lilue J, Müller UB, Steinfeldt T, Howard JC. 2013. Reciprocal virulence and resistance polymorphism in the relationship between *Toxoplasma gondii* and the house mouse. *eLife*, 2, e01298.
- Lindsay DS, Dubey JP. 2007. Toxoplasmosis in wild and domestic animals, in *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan, perspective and methods. Weiss L, Kami K, Editors. Academic Press: London. p. 133–152.

18. Lippens C, Estoup A, Hima K, Loiseau A, Tatar C, Dalecky A, Bâ K, Kane M, Diallo M, Sow A, Niang Y, Piry S, Berthier K, Leblois R, Duplantier JM, Brouat C. 2017. Genetic structure and invasion history of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: a legacy of colonial and contemporary times. *Heredity*, 119, 64–75.
19. Mercier A. 2010. Approche écologique, épidémiologique et génétique de la biodiversité de *Toxoplasma gondii* en zone tropicale humide: exemples du Gabon et de la Guyane Française. Limoges University.
20. Mercier A, Garba M, Bonnabau H, Kane M, Rossi J-P, Dardé M-L, Dobigny G. 2013. Toxoplasmosis seroprevalence in urban rodents: a survey in Niamey, Niger. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 399–407.
21. Müller UB, Howard JC. 2016. The impact of *Toxoplasma gondii* on the mammalian genome. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 19–25.
22. Muradian V, Ribeiro Ferreira L, Gallucci Lopes E, de Oliveira Esmierini P, de Jesus Pena HF, Martins Soares R, Gennari SM. 2012. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *Journal of Parasitology*, 98, 128–134.
23. Murphy RG, Williams RH, Hughes JM, Hide G, Ford NJ, Oldbury DJ. 2008. The urban house mouse (*Mus domesticus*) as a reservoir of infection for the human parasite *Toxoplasma gondii*: an unrecognised public health issue? *International Journal of Environmental Health Research*, 18, 177–185.
24. Ndiaye D, Sène PD, Ndiaye M, Faye B, Ndiaye JL, Ndir O. 2011. Update on toxoplasmosis prevalence based on serological tests in pregnant women in Dakar, Senegal from 2002 to 2006. *Médecine Tropicale*, 71, 101–102.
25. Nicolle C, Manceaux L. 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 148, 369.
26. Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F. 2005. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 328–336.
27. Owen MR, Trees AJ. 1998. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology*, 116, 299–304.
28. Panguit LJ, Gbati OB, KamgaWaladjo AR, Bakou SN. 2013. Point sur la toxoplasmose en Afrique de l'ouest et du centre. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, 11, 29–40.
29. Pélissier P. 1983. Atlas du Sénégal. Éditions Jeune Afrique: Paris.
30. Reperant LA, Hegglin D, Tanner I, Fischer C, Deplazes P. 2009. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. *Parasitology*, 136, 329–337.
31. Sikes RS, Gannon WI, The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92, 235–253.
32. Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.
33. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, 217–220.

Cite this article as: Brouat C, Diagne CA, Ismaïl K, Aroussi A, Dalecky A, Bâ K, Kane M, Niang Y, Diallo M, Sow A, Galal L, Piry S, Dardé M & Mercier A. 2018. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in commensal rodents sampled across Senegal, West Africa. *Parasite* 25, 32.



An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues Parasite (print and online editions, 1994-2012) and Annales de Parasitologie Humaine et Comparée (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
<http://parasite.edmgr.com/>

Résumé

Toxoplasma gondii est un protozoaire zoonotique ubiquiste capable d'infecter tous les homéothermes dont l'homme. Un contraste géographique marqué a été relevé à l'échelle globale concernant la diversité génétique et la pathogénicité chez l'homme des souches de ce parasite. Un nombre croissant d'études montre l'importance de considérer l'influence du facteur souche parasitaire dans l'étude de l'épidémiologie de la toxoplasmose humaine. Cependant, les données de diversité génétique demeurent très limitées pour de larges régions du monde dont l'Asie et l'Afrique. Egalement, les déterminants de la structure spatiale des populations de *T. gondii* dans le monde demeurent mal compris. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence des échanges humains sur l'évolution des populations du parasite en Afrique, et plus particulièrement au Sénégal.

Nos résultats soutiennent un rôle important des rongeurs invasifs qui accompagnent les échanges humains dans l'introduction de souches au niveau des zones portuaires du pays par voie maritime. Nos résultats suggèrent également un rôle de la souris invasive *Mus musculus domesticus* dans la contre-sélection de la lignée clonale Africa 1, la lignée prédominante de *T. gondii* en Afrique de l'Ouest. Ces nouveaux éléments éclairent sur une partie des mécanismes qui régissent le fonctionnement des populations de *T. gondii*. D'autres études réalisées dans différents contextes épidémiologiques, alliées à des études expérimentales, seront nécessaires pour donner une juste mesure de l'influence de ces interactions hôtes-parasites sur l'épidémiologie de la toxoplasmose.

Mots-clés : *Toxoplasma gondii* - rongeurs - petits mammifères - Génétique des populations - Epidémiologie

Abstract

Toxoplasma gondii is a ubiquitous zoonotic protozoan capable of infecting all homeotherms including humans. A marked geographical contrast has been noted at the global scale concerning the genetic diversity and pathogenicity in humans of strains of this parasite. A growing number of studies show the importance of considering the influence of strain factor in the study of the epidemiology of human toxoplasmosis. However, genetic diversity data remain very limited for large regions of the world including Asia and Africa. Also, the determinants of the spatial structure of *T. gondii* populations worldwide remain poorly understood. During this work, we were interested in the influence of human exchanges on the evolution of parasite populations in Africa, and more particularly in Senegal. Our results support an important role of invasive rodents that accompany human exchanges in the introduction of strains at the port areas of the country through maritime trade. Our results also suggest a role of the invasive mouse *Mus musculus domesticus* in the counterselection of the clonal lineage Africa 1, the predominant lineage of *T. gondii* in West Africa. These new elements shed light on some of the mechanisms that shape *T. gondii* populations. Further studies in different epidemiological situations, combined with experimental studies, will be needed to accurately measure the influence of these host parasite interactions on the epidemiology of toxoplasmosis.

Keywords : *Toxoplasma gondii* – rodents - small mammals - population genetics - Epidemiology

