

UNIVERSITE DE LIMOGES

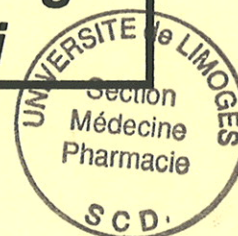
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2000



THESE N° 318/12

**Apport des microsattellites dans le typage
des isolats de *Toxoplasma gondii***



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

présenté et soutenu publiquement le 23 juin 2000 à Limoges

par

Monsieur Daniel AJZENBERG

Né le 26 mai 1969 à TOULOUSE

JURY

Monsieur le Professeur G. DREYFUSS

Président

Madame le Professeur ML. DARDE

Juge

Monsieur le Professeur G. HABRIOUX

Juge

Monsieur le Professeur JP. SEGUELA

Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS: Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur LE Professeur DREYFUSS Gilles

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

BERNARD Michel PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD Claudine BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques CHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane CHIMIE GENERALE ET MINERALE

DREYFUSS Gilles PARASITOLOGIE

GHESTEM Axel BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard TOXICOLOGIE

MOESCH Christian HYGIENE

LOUDART Nicole PHARMACODYNAMIE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**

TITRES DES PROFESSEURS POUR LA REDACTION DES DEDICACES

PROFESSEUR DES UNIVERSITES de ou d'... + mention des titres dans l'ordre dans lequel ils apparaissent ci-dessous:

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE PRATICIEN HOSPITALIER
ADENIS Jean-Paul	OPHTALMOLOGIE OPHTALMOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
ALAIN Luc	CHIRURGIE INFANTILE CHIRURGIEN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
ARNAUD Jean-Paul	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE CHIRURGIEN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
BARTHE Dominique	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE BIOLOGISTE DES HOPITAUX
BEDANE Christophe	DERMATOLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX
BENSAID Julien	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE MEDECIN DES HOPITAUX
BERTIN Philippe	DOCTEUR EN MEDECINE DOCTEUR EN SCIENCES RHUMATOLOGUE DES HOPITAUX PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE DOYEN HONORAIRE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
BOULESTEIX Jean	PEDIATRIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
BOUTROS-TONI Fernand	BIOSTATISTIQUES ET INFORMATIQUE MEDICALE BIOLOGISTE DES HOPITAUX DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES DOCTEUR EN BIOLOGIE HUMAINE: MATHEMATIQUES ET STATISTIQUES LAUREAT DE L'ACADEMIE NATIONALE DE MEDECINE

CATANZANO Gilbert	ANATOMIE PATHOLOGIQUE BIOLOGISTE DES HOPITAUX
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE PROFESSEUR DES UNIVERSITES CHIRURGIEN DES HOPITAUX
CLAVERE Pierre	CANCEROLOGIE RADIOTHERAPIE PRATICIEN HOSPITALIER
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE CHIRURGIEN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
CORNU Elisabeth	PRATICIEN HOSPITALIER
CUBERTAFOND Pierre	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE CHIRURGIEN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE PRATICIEN HOSPITALIER CHEF DE SERVICE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel	PEDIATRIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
DENIS François	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE BIOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
DESCOTTES Bernard	ANATOMIE CHIRURGIEN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
DUDOGNON Pierre	REEDUCATION FONCTIONNELLE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE CHIRURGIEN DES HOPITAUX
DUMAS Michel	NEUROLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL MEDECIN DES HOPITAUX
DUPUY Jean-Paul	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE ELECTRORADIOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
FEISS Pierre	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE ANESTHESIOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE PRATICIEN HOSPITALIER
GAROUX Roger	PEDOPSYCHIATRIE PSYCHIATRE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
GASTINNE Hervé	REANIMATION MEDICALE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
HUGON Jacques	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE CHEF DE SERVICE

LABROUSSE Claude	REEDUCATION FONCTIONNELLE MEDECIN DES HOPITAUX
LABROUSSE François	ANATOMIE PATHOLOGIQUE PRATICIEN HOSPITALIER CHEF DE SERVICE
LASKAR Marc	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE CHIRURGIEN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
LEGER Jean-Marie	PSYCHIATRIE D'ADULTES PSYCHIATRE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
LEROUX-ROBERT Claude	NEPHROLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
MABIT Christian	ORTHOPEDIE-TRAUMATOLOGIE CHIRURGIEN DES HOPITAUX
MAUBON Antoine	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE MEDECIN DES HOPITAUX
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert	PHYSIOLOGIE BIOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE CLINIQUE MEDECIN DES HOPITAUX
MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE NEUROCHIRURGIEN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE CHIRURGIEN DES HOPITAUX
NATHAN-DENIZOT Nathalie	PROFESSEUR DES UNIVERSITES D'ANESTHESIE REANIMATION CHIRURGICALE MEDECIN DES HOPITAUX
PERDRISOT Rémy	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE BIOLOGISTE DES HOPITAUX
PILLEGAND Bernard	HEPATOLOGIE-GASTRO-ENTEROLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
PIVA Claude	MEDECINE LEGALE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE
PRALORAN Vincent	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE
RIGAUD Michel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE BIOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
ROUSSEAU Jacques	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE ELECTRORADIOLOGISTE DES HOPITAUX
SAUTEREAU Denis	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE PRATICIEN HOSPITALIER

SAUVAGE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE OTO-RHINO-LARYNGOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	PRATICIEN HOSPITALIER CHEF DE SERVICE
VALLAT Jean-Michel	NEUROLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX
VALLEIX Denis	ANATOMIE CHIRURGIEN DES HOPITAUX
VANDROUX Jean-Claude	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE BIOLOGISTE DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
VIDAL Elisabeth	MEDECINE INTERNE CHEF DE SERVICE
VIGNON Philippe	REANIMATION MEDICALE MEDECIN DES HOPITAUX
VIROT Patrice	CARDIOLOGIE MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES MEDECIN DES HOPITAUX CHEF DE SERVICE
BUCHON Daniel	MEDECINE GENERALE MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur G. DREYFUSS
Professeur des Universités de Parasitologie
Assesseur de la Faculté de Pharmacie

Nous vous remercions avec le plus profond respect du grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de cette thèse. Nous vous remercions également de la qualité des cours particulièrement vivants que vous nous avez prodigués, ainsi que de l'extrême amabilité que vous avez toujours manifestée à notre égard.

A notre directeur de thèse

Madame le Professeur M.L. DARDE
Professeur des Universités de Parasitologie
Praticien Hospitalier
Chef de service

Nous sommes réellement heureux de vous exprimer notre profonde reconnaissance et ce à plusieurs titres. Pendant ce long parcours qu'est la formation d'un interne en Biologie Médicale, il nous arrive souvent d'errer dans de profondes solitudes où l'on aimerait bien quelquefois avoir l'avis éclairé d'un mentor sur des aspects délicats de cette discipline. Nous considérons comme une chance de vous avoir eue pour Maître en Parasitologie et en Mycologie. La clarté de vos cours théoriques ainsi que le temps, la patience et la gentillesse infinies que vous nous avez toujours consacrés dans l'approche pratique de ces sciences n'ont d'égal que votre compétence absolue en la matière. Cet intérêt que nous portons à la Parasitologie, c'est bien évidemment à vous que nous le devons.

C'est vous qui nous avez proposé ce travail. Nous savons que ce sujet vous tient particulièrement à cœur; la confiance que vous nous avez témoignée à plusieurs reprises nous honore. Nous espérons nous montrer digne, dans l'exercice ultérieur de nos activités, de l'enseignement que vous nous avez prodigué.

A nos Juges

Monsieur le Professeur G. HABRIOUX
Professeur des Universités de Biochimie fondamentale
Assesseur de la Faculté de Pharmacie

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail et nous vous en remercions. J'ai eu la chance de travailler avec vous dans l'intérêt des internes en Pharmacie de Limoges; vous avez toujours été à l'écoute de nos problèmes et les avez résolus avec un art consommé en manifestant la plus grande gentillesse. Nous vous en remercions également.

A Monsieur le Professeur J.P. SEGUOLA
Professeur des Universités de Parasitologie
Chef de service

L'enthousiasme que vous avez manifesté en acceptant de juger cette thèse nous touche sincèrement. Votre compétence universellement reconnue en la matière honore considérablement notre travail. Nous vous remercions de votre présence et exprimons notre plus profonde reconnaissance. De plus, nous profitons de cette occasion, au nom de tous les internes en Pharmacie de l'inter région Sud-Ouest, pour vous remercier de l'intérêt et de la disponibilité que vous nous avez toujours manifestés en tant que coordonnateur, malgré votre emploi du temps très chargé. Enfin nous voudrions remercier en votre nom toute l'équipe de votre laboratoire qui nous a toujours accueilli très chaleureusement lors de nos divers séjours toulousains.

Soyez assuré de notre plus profond respect.

Je dédie ce travail :

à mon grand-père Lew : tu es mon modèle à tout jamais.

aux miens : Eloa petite sœur des anges, Thaïs radieuse comme les neiges d'antan, Cathy belle et rebelle, mon père ce héros, ma mère qui n'est qu'Amour et ma sœur Nancy que j'aime comme un frère.

aux personnages bienveillants que sont Jean-claude et Paulette, leur générosité quasi proverbiale plane sur les miens de façon tutélaire; Sylvie la sibylline et Tristan qui j'en suis sûr veillera sur mes filles.

à mes chers amis qui se reconnaîtront dans la salle.

à tous ceux qui m'ont aidé dans ce travail : aux biologistes qui nous ont envoyé leur souches, à Dominique Genêt pour ses talents statistiques, à Bernard Bouteille à l'origine du beau cycle du toxoplasme et de quelques manipulations informatiques, à mon père garant de la qualité de l'impression colorée, à Cathy qui a utilisé son hérité fortement marquée par l'éducation nationale pour corriger un maximum de fautes d'orthographes, à tous ceux qui travaillent dans le service de Procréation Médicalement Assistée pour leur fort soutien moral, au personnel du laboratoire de Parasitologie pour leur gentillesse sans failles; enfin une mention spéciale à Christian Baertich et Grégoire Cochu dont le soutien psychologique dans les moments de doute restera pour moi l'expression de la plus haute amitié.

à ceux dont le génie rendent l'Homme meilleur : quintessences de l'Humanité, je pense à vous.

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : LA DIVERSITE DU TOXOPLASME	3
I- Toxoplasme et toxoplasmose	4
1- Description du parasite	4
1-1 Morphologie	4
1-1-1 Tachyzoïtes	4
1-1-2 Kystes tissulaires et bradyzoïtes	4
1-1-3 Oocystes et sporozoïtes	5
1-2 Cycle de <i>T.gondii</i>	6
2- La diversité de la toxoplasmose humaine	8
2-1 Prévalence chez l'homme	8
2-2 Modes de contamination	8
2-3 Epidémies de toxoplasmoses	10
2-4 Manifestations cliniques chez l'homme	12
2-4-1 Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent	12
2-4-2 Toxoplasmose du sujet immunodéprimé	13
2-4-3 Toxoplasmose congénitale	15
2-4-3-1 Formes graves	16
2-4-3-2 Formes bénignes et asymptomatiques	16
3- La diversité biologique	17
4- La diversité antigénique	17
4-1 Antigènes somatiques de <i>T. gondii</i>	17
4-1-1 Antigènes de surface	18
4-1-2 Complexe apical	18
4-1-3 Enzymes	18
4-1-4 Autres protéines	19
4-2 Mise en évidence d'une diversité antigénique	19
5- La diversité génétique	20
5-1 Génome de <i>T.gondii</i>	20
5-1-1 Gènes	21
5-1-2 Expressed Sequence Tags (EST)	24

5-2 Le typage génétique de <i>T. gondii</i> : méthodes et résultats	. 25
5-2-1 Analyse isoenzymatique	. 25
5-2-2 RFLP ou PCR-RFLP	. 26
5-2-2-1 Sur loci à copies uniques	. 27
5-2-2-2 Sur loci à copies multiples	. 28
5-2-3 RAPD	. 29
5-2-4 Typage par séquençage D'ADN ou D'ARN	. 30
5-2-4-1 <i>GRA4</i>	. 30
5-2-4-2 <i>SAG1</i>	. 30
5-2-4-3 <i>SAG2</i>	. 32
5-2-4-4 ADN polymérase alpha	. 33
5-2-4-5 NTPase I et II	. 34
5-2-4-6 <i>ssrRNA</i>	. 34
5-2-5 Caryotype moléculaire	. 35
5-2-6 Microsatellites du gène de la bêta-tubuline	. 35
5-3 Limites du typage génétique de <i>T.gondii</i>	. 36
II- Les corrélations entre diversité génétique et diversité biologique	. 39
1- Clonalité	. 39
1-1 Critères de clonalité	. 39
1-1-1 Sur-représentation d'un génotype multilocus particulier	. 39
1-1-2 Corrélation entre des marqueurs génétiques indépendants	. 40
1-1-3 Absence de nombreux génotypes recombinants possibles	. 40
1-2 Explications biologiques de la clonalité	. 42
2- Propriétés biologiques	. 43
2-1 Virulence chez la souris	. 43
2-2 Oocystogénèse chez le chat	. 43
2-3 Vitesse de multiplication en culture cellulaire	. 43
3- Répartition géographique	. 44
4- Toxoplasmoses humaines	. 45
5- Toxoplasmoses animales	. 46
III- Les microsatellites	. 49

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	53
I- Objectifs de l'étude	54
II- Matériel et méthodes	55
1- Stocks et isolats de <i>T. gondii</i>	55
2- Extraction de l'ADN	56
3- Choix des microsatellites	56
4- Choix des amorces	58
5- Conditions de PCR	58
6- Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR	60
7- Electrophorèse de l'ADN amplifié sur séquenceur automatique	63
7-1 Principe	63
7-2 Utilisation	64
8- Analyse statistique des données	65
9- Mise en évidence expérimentale d'infections mixtes chez la souris	65
III Résultats	66
1-Résultats de la PCR et de l'électrophorèse sur séquenceur automatique des produits PCR amplifiés	66
2-Typage génétique de la population globale	69
3-Typage génétique et répartition géographique	74
3-1 Pays d'origine	74
3-2 Répartition des génotypes dans les différents pays	76
4-Typage génétique et toxoplasmose	78
4-1 Typage génétique et toxoplasmoses congénitales.	81
4-2 Typage génétique et toxoplasmoses acquises	84
4-3 Typage génétique et toxoplasmoses animales	86
5- Typage génétique des stocks de la souche RH	90
6- Génotypes identiques	91
7- Mise en évidence expérimentale d'une infection mixte chez la souris	92
IV Discussion	94
CONCLUSION	117
TROISIEME PARTIE : BIBLIOGRAPHIE	118
QUATRIEME PARTIE : ANNEXES	126

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii a été découvert au début du siècle en Tunisie par deux médecins français Charles Nicolle et Louis Herbert Manceaux chez un rongeur d'Afrique du nord, *Ctenodactylus gondi* (Nicolle et Manceaux 1908). De façon quasi simultanée, l'italien Alfonso Splendore le décrit chez le lapin au Brésil (Splendore 1908). Par la suite, ce parasite a été isolé chez de nombreuses autres espèces animales dans divers endroits.

Ceci illustre assez bien une des caractéristiques de *T. gondii*: son ubiquité. Il s'agit en effet d'un des protozoaires parasites les plus répandus dans le monde : on le trouve sous toutes les latitudes et chez tous les animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Cette ubiquité tant géographique que zoologique laisse deviner une grande diversité du toxoplasme, notamment au niveau génétique.

Chez l'homme, depuis la première description par l'ophtalmologiste tchèque Josef Jankù en 1921 d'un cas de toxoplasmose congénitale (Jankù 1923) et la première mise en évidence de *T. gondii* dans les infections humaines par Wolf et coll. (1939) chez un enfant atteint d'encéphalite, on a pu mesurer la grande diversité des formes cliniques occasionnées par le toxoplasme. Si le système immunitaire joue un rôle fondamental (les formes sévères sont en règle observées dans les cas d'immunodépression acquise comme le SIDA, ou dans les cas d'immaturation du système immunitaire avec les toxoplasmoses congénitales), il n'explique pas toujours la diversité des formes cliniques rencontrées. Ainsi, des cas de toxoplasmoses très sévères ont été décrits chez des sujets immunocompétents, alors qu'en principe ne sont observées que des formes bénignes ou pauci symptomatiques. Au cours du SIDA, seulement un tiers des patients infectés par le toxoplasme font des réactivations toxoplasmiques. Enfin, les toxoplasmoses congénitales présentent des degrés de gravité très variables.

On peut donc penser que des facteurs liés à la souche pourraient expliquer la diversité du toxoplasme. On sait qu'au niveau biologique, des différences existent entre les souches notamment en ce qui concerne la virulence chez la souris, permettant de les classer en virulentes, avirulentes ou de virulence intermédiaire. On peut aussi évaluer la diversité du toxoplasme au niveau antigénique, mais c'est la diversité génétique qui a été la plus étudiée avec plusieurs techniques utilisables pour mettre en évidence un polymorphisme génétique.

Nous nous proposons dans ce travail d'appliquer au toxoplasme une technique récente dans l'étude du polymorphisme de l'ADN, largement utilisée chez l'homme et de nombreux eucaryotes : l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des microsatellites contenus dans le génome et la mesure de leur longueur sur séquenceur automatique. Le grand polymorphisme génétique détecté par cette technique a pour but de mieux comprendre la corrélation de certains génotypes avec la pathologie et l'épidémiologie de la toxoplasmose, mais également d'utiliser cette technique comme outil dans la détection d'infections mixtes naturelles et expérimentales, la détection de contaminations de laboratoires et la responsabilité d'une souche dans les épidémies de toxoplasmose.

PREMIERE PARTIE

LA DIVERSITE

DU

TOXOPLASME

I- Toxoplasme et toxoplasmose

1- Description du parasite

1-1 Morphologie

Toxoplasma gondii existe sous trois formes évolutives.

1-1-1 Tachyzoïtes

En microscopie optique, ils apparaissent comme des éléments arciformes de 4 à 7 μm de long sur 1,5 à 4 μm de large. Ils ont une extrémité postérieure arrondie et une extrémité antérieure effilée. Ce sont des formes à multiplication rapide et obligatoirement intracellulaire. Ils sont capables de pénétrer de façon active et rapide (20 secondes) n'importe quel type cellulaire grâce à leur complexe apical.

Ce complexe apical commun à tous les Apicomplexa, situé comme son nom l'indique dans la partie apicale du parasite contient des structures (conoïde, granules denses, rhoptries, micronèmes et microtubules) impliquées dans la motilité du parasite, la reconnaissance et l'invasion de la cellule hôte ainsi que dans la constitution de la vacuole parasitophore dans laquelle se multiplie le tachyzoïte par un processus d'endodyogénie.

Ces tachyzoïtes s'observent pendant la phase aiguë du parasitisme. Ce sont des formes très fragiles, peu résistantes dans le milieu extérieur.

1-1-2 Kystes tissulaires et bradyzoïtes

Ce sont des formes tissulaires quiescentes observées dans les infections chroniques et persistant pendant toute la vie de l'hôte.

En microscopie optique, ces kystes apparaissent comme des éléments sphériques de 15 à 200 μm de diamètre, dont la paroi est épaisse et réfringente (cette dernière résulte d'une modification de la membrane de la vacuole parasitophore).

Ils renferment quelques dizaines à quelques milliers de bradyzoïtes serrés les uns contre les autres. Les bradyzoïtes, formes à multiplication ralentie, proviennent d'une transformation des tachyzoïtes par modifications ultrastructurales et acquisition de nouveaux antigènes.

Les kystes persistent préférentiellement dans les cellules à longue durée de vie : neurones, cellules musculaires et cellules nerveuses rétinienne. Les kystes sont plus résistants que les tachyzoïtes (une congélation à - 20°C pendant plusieurs heures diminue l'infectivité du kyste, une cuisson de 20 minutes à 50°C les détruit).

1-1-3 Oocystes et sporozoïtes

Ils sont le résultat du cycle sexué entéro-épithélial chez l'hôte définitif (félidés).

Après ingestion de kystes ou d'oocystes, les toxoplasmes libérés envahissent les cellules épithéliales intestinales. Après une phase de multiplication asexuée se produit une multiplication sexuée, grâce à la différenciation d'éléments asexués en gamètes mâles et femelles, aboutissant après fécondation à la formation d'un zygote ou **oocyste**. Ce dernier est éliminé avec les fèces du félin. Il est alors non sporulé, c'est à dire non infestant. C'est, en microscopie optique, un élément ovoïde de 10 à 14 µm à paroi épaisse contenant un sporoblaste.

La sporulation ou sporogonie se produit dans de bonnes conditions de température et d'humidité (en 2 à 7 jours à 27°C en milieu humide) : le sporoblaste se divise en deux, chacun se transformant en sporocyste. Puis, dans chaque sporocyste s'individualisent 4 sporozoïtes. L'oocyste est alors infestant.

Les oocystes sont particulièrement résistants dans le milieu extérieur, mais sont sensibles à la dessiccation et à la chaleur (10 minutes à 50 °C). Ils résistent également à divers agents chimiques comme l'eau de Javel.

1-2 Cycle de *T.gondii*

Le cycle complet de *T.gondii*, schématisé dans la figure 1, fait intervenir un hôte définitif qui appartient à la famille des félidés, et des hôtes intermédiaires qui peuvent être n'importe quel homéotherme (mammifères et oiseaux).

Chez l'hôte définitif se produit la multiplication sexuée dans les cellules épithéliales intestinales avec formation d'un oocyste, élimination avec les fèces et sporulation dans le milieu extérieur.

Ces oocystes infestants sont ingérés par l'hôte intermédiaire qui va développer une infection active par l'intermédiaire de formes à multiplication rapide : les tachyzoïtes. Puis de façon concomitante à l'établissement de la réaction immunitaire, les tachyzoïtes vont se transformer en une forme à multiplication ralentie : les bradyzoïtes contenus dans des kystes. Ces derniers sont localisés dans les muscles, le système nerveux central de l'hôte intermédiaire et persistent pendant toute la vie de l'individu.

L'hôte définitif se contamine par carnivorisme en mangeant de la viande d'hôte intermédiaire contenant des kystes.

Il existe également un cycle dit incomplet uniquement entre hôtes intermédiaires, par carnivorisme, sans passer par l'hôte définitif. L'homme est un hôte intermédiaire de cette zoonose lors de son cycle **domestique** faisant intervenir comme hôte définitif le chat domestique et comme hôtes intermédiaires moutons et porcs essentiellement, mais aussi les rongeurs sauvages et péri-domestiques, les oiseaux, les poulets, les lapins, les bovins etc... Il faut savoir qu'il existe également un cycle **sauvage** où l'hôte définitif n'est plus le chat, mais des félidés sauvages (cougars, ocelots, lynx...). L'homme, normalement absent des régions où se produit ce cycle sauvage, n'y est impliqué que de façon **exceptionnelle**.

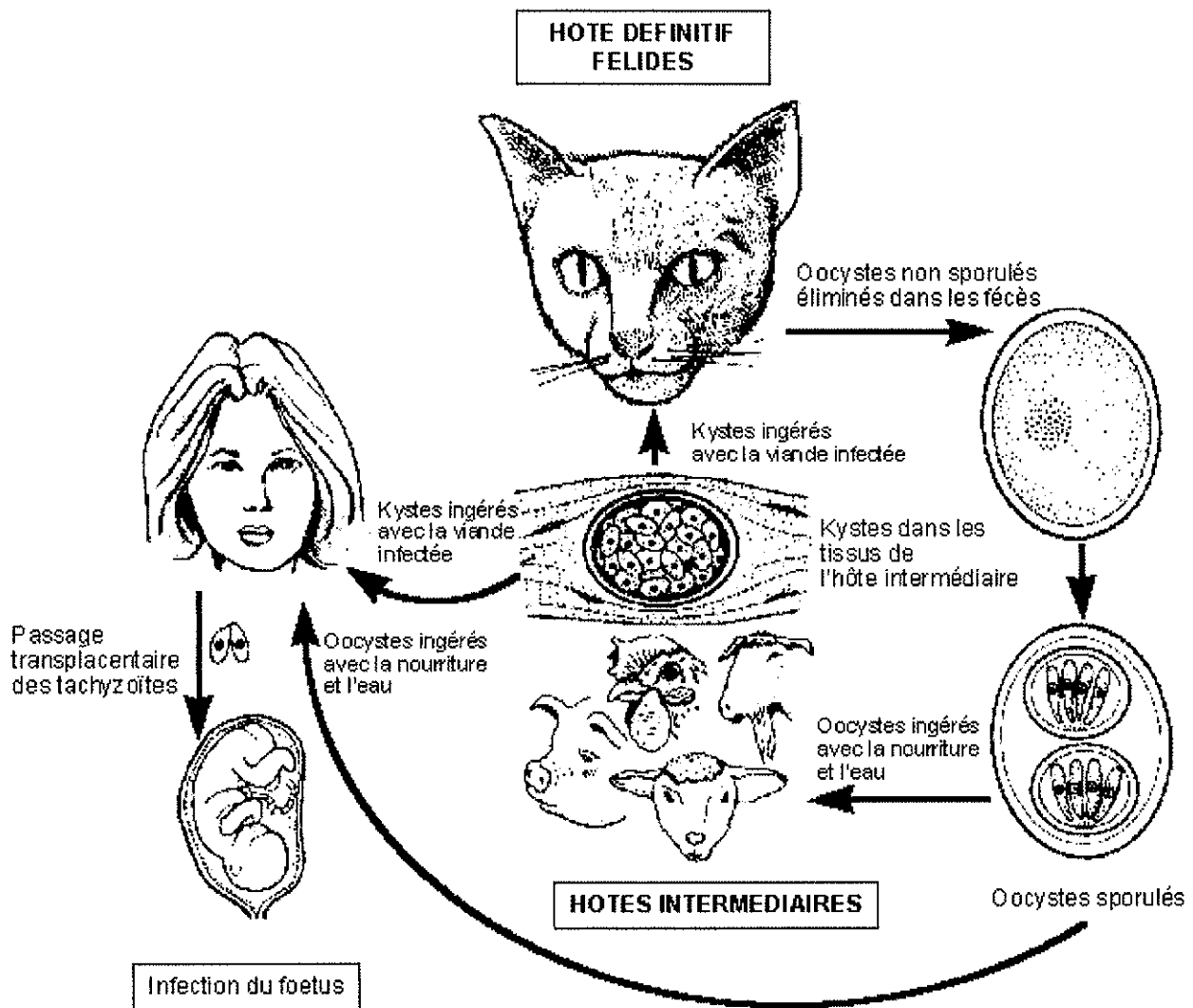


Figure 1 : cycle de *Toxoplasma gondii* d'après Dubey et Beattie (1988)

2- La diversité de la toxoplasmose humaine

2-1 Prévalence chez l'homme

Il semblerait que la séro-prévalence d'anticorps anti toxoplasmes chez l'homme soit en nette diminution dans les pays développés.

Dans une étude menée en 1962 chez des recrues de l'armée américaine, la séro-prévalence était de 14,4%, alors qu'elle n'est plus que de 9,5% en 1989 chez ces jeunes recrues militaires (Smith et coll. 1996).

De même, en France, le taux d'immunité vis à vis de la toxoplasmose chez les femmes enceintes a diminué (54,3% en 1995) depuis la fin des années 60 (Ancelle et coll. 1996). Cette prévalence en France présente des disparités régionales très marquées : cela va de 37,9% dans le Limousin à 68,3% dans l'Aquitaine (Ancelle et coll. 1996).

Cette disparité se retrouve également entre les différents pays. En Europe, la France fait partie avec la Pologne des zones de plus forte prévalence, alors que la Grande Bretagne ou la Norvège sont des zones de très faible prévalence (Dupouy-Camet et coll. 1993). De même, au sein du continent américain, des différences importantes existent : l'Amérique du nord présente des prévalences très faibles (<25% pour les USA), alors qu'en Amérique du sud, les prévalences sont élevées, allant de 30 à 80% (Dupouy-Camet et coll. 1993).

2-2 Modes de contamination

Il existe deux modes majeurs de contamination pour l'homme : soit à partir des kystes tissulaires contenus dans la viande, soit à partir des oocystes émis avec les fèces des félinés.

Les facteurs de risque réels de contamination ont été évalués en France par Baril et coll. (1996) chez des femmes enceintes non immunisées contre la toxoplasmose, qui ont présenté une séroconversion pendant l'étude. Un questionnaire détaillé remis à chaque femme enceinte a permis d'identifier ces facteurs de risque.

La contamination à partir de kystes contenus dans la viande est le mode principal de contamination dans les pays à haut niveau de vie. La consommation de viande de mouton et de porc insuffisamment cuite a le rôle le plus important dans la survenue d'une séroconversion en France. C'est le mouton, consommé peu cuit en France, qui est le plus souvent responsable.

La séro-prévalence chez l'animal varie là aussi selon les pays, voire les régions, mais aussi en fonction de l'espèce animale.

Chez le mouton, de très nombreuses enquêtes de séro-prévalence ont été menées dans le monde, car la toxoplasmose représente la première cause d'avortement chez les ovins (Owen et Trees 1999). A titre d'exemple, la séro-prévalence ovine a été estimée en Limousin à 38% (Nicolas et Pestre-Alexandre 1993).

Chez le porc domestique, de nombreuses études de séro-prévalence ont été réalisées aux USA étant donnée l'importance de cet animal dans la contamination humaine dans ce pays : 47,4% dans des fermes de Nouvelle-Angleterre (Gamble et coll. 1999), 22,2% dans un abattoir de l'Iowa (Dubey et coll. 1995).

Chez la volaille, notamment chez le poulet, les enquêtes sont rares. Devada et coll. (1998) ont trouvé une séroprévalence de 39,5% chez 185 poulets lors d'une étude en Inde.

Enfin, chez les bovins, les enquêtes sérologiques montrent souvent un taux faible de positivité. De plus, les kystes sont éliminés assez rapidement par l'animal (Nicolas et Pestre-Alexandre 1993), expliquant la rareté d'isolement de souches chez ces animaux et l'implication certainement faible de la viande de boeuf dans la contamination humaine.

Les différences de prévalence humaine entre divers pays peuvent s'expliquer par les habitudes alimentaires. Ainsi, le fait de consommer la viande peu cuite en France et très cuite en Angleterre explique à lui seul les différences de prévalence entre les deux pays (Dupouy-Camet et coll. 1993). Le rôle du mouton dans la transmission de la toxoplasmose à l'homme, contrairement en France, est minime aux USA car les américains en consomment peu. Chez ces derniers, c'est surtout la viande de porc, abondamment consommée, qui est incriminée.

On pense également que la diminution nette de la prévalence observée en France et aux USA depuis les années 60 est due en partie à la consommation plus importante de viande congelée qui diminue l'infectivité des kystes.

Chez le chat, la séro-prévalence est plus forte chez ceux vivant en dehors du foyer que chez les chats domestiques. Elle est en moyenne de 58,5% en France (Nicolas et Pestre-Alexandre 1993). Le rôle direct du chat domestique à partir du pelage ou de la litière en France est minime du fait essentiellement d'une bonne information des propriétaires (Baril et coll. 1996) qui, de plus, ne leur donnent pratiquement que de la nourriture industrielle en boîte. En revanche, le rôle indirect des félidés qui vivent à l'extérieur du foyer par l'émission d'oocystes dans leur fèces qui souillent le sol, les légumes ou les fruits, représente le mode principal de contamination dans les pays à bas niveau d'hygiène. En France, Baril et coll. (1996) ont montré une corrélation significative entre le niveau d'hygiène lors de la préparation de repas (lavage des mains, des ustensiles de cuisine et des crudités) et la survenue de séroconversions chez les femmes enceintes.

2-3 Epidémies de toxoplasmoses

La toxoplasmose humaine survient la plupart du temps sous forme de cas isolés. C'est du moins ce que l'on constate dans les formes cliniquement exprimées où le diagnostic de toxoplasmose peut être posé. L'abondance des formes asymptomatiques non diagnostiquées dans cette maladie par rapport aux formes cliniques, ainsi que le mode de contamination de la toxoplasmose laisse supposer que des épidémies de toxoplasmose peuvent survenir plus fréquemment que l'on ne pense.

Des études ont montré l'existence de véritables épidémies contractées soit à partir de l'ingestion par quelques individus de viande contaminée insuffisamment cuite, soit à partir d'eau de boisson souillée par des oocystes présents dans des fèces de félidés infectés pouvant donner lieu à une épidémie touchant un très grand nombre de personnes. Chaque fois, les épidémies sont révélées grâce à l'existence de formes cliniques au sein de ces épidémies.

Il existe peu d'articles faisant état d'épidémies de toxoplasmose par ingestion de viande contaminée. Le plus récent est celui de Choi et coll. (1997) qui relate d'une part l'apparition de chorioretinite unilatérale chez 3 individus immunocompétents en Corée, un mois après avoir mangé ensemble du foie et de la rate crus d'un sanglier qu'ils venaient de chasser. D'autre part, les auteurs décrivent l'apparition de lymphadénopathies chez cinq jeunes militaires immunocompétents, toujours en Corée, une semaine après avoir mangé ensemble viande et viscères crus de porc domestique. Il est intéressant de noter que les patients ont développé des symptômes identiques dans chacune des deux épidémies (chorioretinite pour la première, lymphadénopathies pour la deuxième).

Des épidémies de toxoplasmose liées à l'ingestion d'eau de boisson ont été rapportées. Le plus souvent, il s'agit de contamination d'un petit nombre de personnes ayant bu de l'eau de source en forêt tropicale. Ainsi Benenson et coll. (1982) décrivent 31 cas confirmés sérologiquement de toxoplasmose aiguë acquise chez des militaires américains en exercice autour du canal de Panama. Debord et coll. (1996) rapportent 4 cas de toxoplasmoses sévères chez des militaires français en opération dans la forêt de la Guyane Française. Dans les deux cas, c'est l'eau de source, pourtant chimiquement désinfectée, contaminée par des fèces de félinés sauvages (ocelots et jaguars) contenant des oocystes qui est probablement à l'origine de l'infection.

Mais la plus importante des épidémies par le nombre d'individus infectés (et la plus inquiétante car mettant en cause l'eau de boisson municipale) est celle rapportée par Bowie et coll. (1997) dans la région de Victoria en Colombie britannique (Canada) entre octobre 1994 et mai 1995 : 100 cas de toxoplasmoses aiguës symptomatiques acquises en rapport avec l'épidémie ont été prouvés sérologiquement chez des sujets habitant la région en cause. Parallèlement, un grand programme de dépistage chez 3812 femmes enceintes résidant dans la région de Victoria a permis de retrouver chez ces femmes 36 cas de toxoplasmose aiguë acquise pendant l'épidémie. Une étroite association a été montrée entre ces infections aiguës et la résidence dans l'aire de distribution d'un réservoir fournissant l'eau de boisson municipale dans la région de Victoria. Ce réservoir à l'origine de cette grande épidémie (estimée, en se basant sur le taux d'infection des 3812 femmes enceintes dépistées, à un nombre compris entre 2894 et 7718 individus infectés sur un total de 321 585 habitants dans la région de Victoria) utilisait une eau de surface qui était traitée uniquement par chloramination sans filtration.

L'hypothèse retenue est une souillure de cette eau par des oocystes (non détruits par la chloramination) présents dans les selles de chats domestiques, voire de cougars présents dans la région.

Burnett et coll. (1998) ont montré que la souche de toxoplasme à l'origine de l'épidémie avait un tropisme oculaire remarquable, puisque sur les 100 patients avec toxoplasmose aiguë sérologiquement prouvée acquise pendant l'épidémie, 20 ont présenté une chorioretinite et avec des taux d'anticorps beaucoup plus élevés que ceux obtenus habituellement chez des patients ayant une toxoplasmose aiguë acquise aux USA ou au Canada.

2-4 Manifestations cliniques chez l'homme

2-4-1 Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

La grande majorité des cas (plus de 80%) correspond à des formes purement **asymptomatiques**. Le diagnostic n'est possible que sérologiquement. Les anticorps détectés traduisent la présence de kystes tissulaires (dans les muscles et le cerveau en particulier) parfaitement tolérés. Ces kystes sont dits latents sur le plan clinique : ils persistent ainsi toute la vie de l'individu, mais peuvent en cas d'immunodépression sévère se réactiver et entraîner alors une toxoplasmose cliniquement apparente.

Les formes symptomatiques peuvent revêtir deux formes :

- La plus fréquente est la **lymphadénopathie toxoplasmique bénigne**. Elle se manifeste volontiers chez l'enfant ou l'adulte jeune par des adénopathies de 1 à 3 cm de diamètre, peu nombreuses, fermes, mobiles à la palpation et de localisation typiquement cervico-occipitales. Sont associés fièvre, asthénie et au point de vue biologique un syndrome mononucléosique. L'évolution bien que favorable est souvent prolongée avec persistance des adénopathies et de l'asthénie pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Le diagnostic différentiel peut se poser avec les autres étiologies de syndrome mononucléosique, mais également si le malade est vu tardivement (disparition des IgM anti toxoplasmes) avec des adénopathies persistantes pouvant évoquer un lymphome. Dans ce dernier cas, c'est la biopsie ganglionnaire qui permet de trancher.

C'est à partir de la biopsie ganglionnaire que l'on peut isoler des souches responsables de lymphadénopathies toxoplasmiques.

- De façon exceptionnelle, **des toxoplasmoses acquises sévères** peuvent être observées chez des sujets parfaitement immunocompétents. Dardé et coll. (1998) décrivent un cas de toxoplasmose pulmonaire avec syndrome infectieux sévère chez un militaire de 35 ans après avoir bu de l'eau désinfectée seulement chimiquement lors d'un séjour de 4 mois dans la forêt profonde de la Guyane française. La souche responsable a été isolée à partir du liquide de lavage broncho-alvéolaire : il s'agit de l'isolat **RUB**. Bossi et coll. (1998) relatent quant à eux un cas de toxoplasmose disséminée associé à un syndrome de Guillain-Barré chez un jeune homme de 21 ans après avoir mangé de la viande insuffisamment cuite de phacochère et de biche pendant un séjour touristique de 3 jours dans la forêt guyanaise française. La souche isolée du sang du patient est l'isolat **VAND**.

Ces deux cas atypiques nous intéressent particulièrement sur le plan génétique, du fait de leur présentation clinique particulière et de leur épidémiologie faisant intervenir un cycle sauvage de la toxoplasmose et non un cycle domestique (les deux étant liés : c'est la faible adaptation à l'homme de ces souches entretenues dans un cycle sauvage qui est vraisemblablement à l'origine de la sévérité de la toxoplasmose).

2-4-2 Toxoplasmose du sujet immunodéprimé

Depuis les années 80, du fait de l'essor des transplantations et surtout de la pandémie de SIDA, les toxoplasmoses de l'immunodéprimé ont acquis un regain d'intérêt. L'origine de la toxoplasmose est soit une primo-infection soit une réactivation de kystes préexistants.

La **toxoplasmose cérébrale** est forme la plus fréquente, notamment au cours du SIDA. Les tableaux neurologiques peuvent être variés :

- forme abcédée pseudo-tumorale, de début souvent brutal, avec des signes déficitaires variés (hémiplégie, aphasie, atteinte de plusieurs nerfs crâniens, convulsions), troubles de la conscience avec fièvre.
- méningo-encéphalite diffuse sans signes de focalisation, d'allure subaiguë avec troubles de la vigilance, céphalées.
- fièvre isolée.

La tomodensitométrie (TDM) est l'examen essentiel pour le diagnostic (lésions hypodenses, arrondies, homogènes entourées d'une zone d'oedème péri-lésionnelle siégeant surtout dans les noyaux gris centraux). L'IRM sert à dépister des lésions non décelées au TDM. Le diagnostic reste difficile, seule la biopsie cérébrale, aux indications très limitées, montrant les tachyzoïtes au sein des zones de nécrose pourrait établir avec certitude le diagnostic de toxoplasmose cérébrale.

Des **toxoplasmoses extra-cérébrales** peuvent survenir : toxoplasmoses pulmonaires associées ou non à une atteinte cérébrale, mais aussi oculaires (choriorétinite), du pancréas, du myocarde. On peut également rencontrer une forme septicémique de très mauvais pronostic avec état de choc et défaillance multiviscérale : la **toxoplasmose disséminée**.

Le SIDA est la première cause de toxoplasmose cérébrale. Cette dernière est la première cause d'atteintes neurologiques au cours du SIDA. En dehors des patients ne se sachant pas séropositifs pour le VIH et pour lesquels la toxoplasmose cérébrale est inaugurale du SIDA, la non-observance de la prophylaxie quand les T CD4 sont inférieurs à 200 par mm³, représente la principale circonstance de survenue de toxoplasmose cérébrale (Bourdillon et coll. 1996). Le pronostic de la toxoplasmose est mauvais au cours du SIDA, malgré le traitement (décès dans 80% des cas à 6 mois).

Si la toxoplasmose cérébrale est la forme la plus fréquemment rencontrée au cours du SIDA, des cas de formes disséminées ou extra-cérébrales peuvent être observées notamment oculaires, mais aussi pulmonaires comme celles décrites par Rabaud et coll. (1999). Les auteurs rapportent deux cas, survenus simultanément, de toxoplasmoses pulmonaires chez les deux membres d'un couple de patients hétérosexuels infectés par une même souche de VIH. Les deux isolats de *T.gondii* obtenus à partir du liquide de lavage broncho-alvéolaire des deux patients sont MAN-NJA pour le mari et LEG-NJA pour son épouse

Lors de greffe de moelle osseuse chez un receveur séropositif pour *T.gondii*, un risque de toxoplasmose grave (disséminée avec atteintes cérébrales) existe le plus souvent par réactivation des kystes présents chez le receveur. Au cours des transplantations d'organes, le risque de réactivation semble moindre comparé aux greffes de moelle : il s'agit le plus souvent d'une contamination du receveur séronégatif pour *T.gondii* par des kystes présents dans le greffon. Le risque de toxoplasmose, le plus souvent disséminée, survient surtout lors de greffes cardiaques, rarement lors de greffes rénales. Lors de lymphomes malins hodgkiniens ou non hodgkiniens, surtout en cours de chimiothérapie aplasante, des toxoplasmoses graves peuvent survenir mais assez rarement.

2-4-3 Toxoplasmose congénitale

En France, le taux global de séroconversions toxoplasmiques est de 4 à 5 pour 1000 grossesses pour une durée d'exposition de 9 mois (Carme et Tirard-Fleury 1996), la fréquence de la toxoplasmose congénitale est de 2 pour 1000 naissances (Fortier et Ajana 1993).

La transmission à l'enfant se fait par l'intermédiaire des tachyzoïtes qui franchissent la barrière placentaire, après l'avoir colonisée, lors d'une primo-infection maternelle survenue classiquement pendant la grossesse, exceptionnellement avant.

Une immunodépression peut réactiver des kystes et entraîner une infection active chez une femme enceinte séropositive pour *T. gondii*, avec risque de transmission foetale.

On peut répartir les formes cliniques de la toxoplasmose congénitale en 2 groupes :

2-4-3-1 Formes graves

Elles sont devenues rares en France de nos jours où elles ne représentent plus que 5% des toxoplasmoses congénitales (Couvreur 1999).

La contamination foetale précoce peut aboutir à la mort in utero, à l'accouchement prématuré ou à terme d'un enfant présentant le tableau de toxoplasmose polyviscérale nécrotico-hémorragique mortelle (Fortier et Ajana 1993).

Des contaminations foetales moins précoces peuvent donner des atteintes neuro-oculaires avec comitialité, méningo-encéphalite, hydrocéphalie ou plus rarement microcéphalie, trouble du tonus et chorioretinite pouvant être associés à une microphthalmie. L'évolution de ces formes est souvent péjorative avec retard psychomoteur et séquelles graves (Fortier et Ajana 1993).

2-4-3-2 Formes bénignes et asymptomatiques

Les formes asymptomatiques (85% selon Wong et Remington 1994) sont à traduction uniquement sérologiques à la naissance, mais la surveillance clinique s'impose pendant des années, car des chorioretinites peuvent se révéler à la puberté ou à l'âge adulte.

Les formes bénignes ou monosymptomatiques (10%) sont caractérisées par une atteinte neuro-ophtalmologique cicatricielle sous forme de calcifications intracrâniennes ou de chorioretinite, cette dernière découverte à la naissance ou le plus souvent dans les mois qui suivent par un fond d'oeil systématique (Fortier et Ajana 1993).

Les atteintes foetales sont plus graves quand elles surviennent en début de grossesse. On estime qu'après la 26ème semaine, le risque de foetopathie patente devient très rare (Couvreur 1999). En revanche, le risque de contamination foetale, en cas d'infection maternelle, augmente avec le stade de la grossesse : sans traitement, ce risque est de 10 à 15% lorsque l'infection maternelle se situe au premier trimestre, 30% pour le second trimestre, et 60% et plus pour le troisième trimestre (Wong et Remington 1994).

3- La diversité biologique

Les différents isolats de toxoplasmes n'ont pas un comportement identique vis à vis de la souris. La virulence d'un isolat pour la souris répond à des critères biologiques bien définis. Si on inocule des tachyzoïtes par voie intrapéritonéale à des souris, trois types de comportement peuvent être observés :

la majorité des isolats entraînent une toxoplasmose **chronique** asymptomatique, objectivée par la présence de kystes dans le cerveau ou les muscles des souris. Ce sont des isolats **avirulents pour la souris**.

les autres isolats peuvent tuer les souris, mais on peut séparer deux groupes :

- Le premier groupe de virulence dite **intermédiaire** entraîne une toxoplasmose subaiguë. Une partie des souris meurt vers le 13-15ème jour, celles qui survivent meurent la plupart du temps d'encéphalite vers 3 à 6 mois.

- Le deuxième groupe est capable de tuer toutes les souris en moins de 10 jours avec un inoculum très faible (moins de 10 tachyzoïtes). Ce sont des isolats hautement **virulents pour la souris**. Ils y déterminent une toxoplasmose aiguë.

Ces isolats hautement virulents pour la souris se distinguent également des autres isolats par une absence d'oocystogénèse chez le chat et par une multiplication plus rapide en culture cellulaire.

4- La diversité antigénique

4-1 Antigènes somatiques de *T. gondii*

Plus de mille antigènes ont été observés par électrophorèse bidimensionnelle, après marquage métabolique du parasite (Fortier et Dubremetz 1993). Parmi ceux ci, quelques uns ont été caractérisés.

4-1-1 Antigènes de surface

Ils ont un rôle dans l'attachement et l'invasion. Cinq antigènes majeurs de surface codés par les gènes *SAG* (1 à 5) ont été caractérisés. Parmi eux l'antigène P30 ou *SAG1* codé par le gène *SAG1* qui représente 5% des protéines du toxoplasme et l'antigène P22 ou *SAG2* codé par le gène *SAG2* sont très immunogènes (antigènes utilisés dans le diagnostic sérologique).

4-1-2 Complexe apical

- Rhoptries

Ils ont un rôle dans l'invasion. Huit antigènes ont été caractérisés codés par les gènes *ROP* (1 à 8) dont celui codé par le gène *ROP 1*.

- Micronèmes

Ils ont un rôle dans la reconnaissance et l'attachement. Trois antigènes ont été décrits, codés par les gènes *MIC* (1 à 3).

- Granules denses

Ils ont un rôle dans la maturation de la vacuole parasitophore et libèrent leur contenu après l'invasion. Huit antigènes ont été décrits, codés par les gènes *GRA* (1 à 8) dont celui codé par *GRA 4*.

4-1-3 Enzymes

Les principales enzymes étudiées chez *T. gondii* sont l'uracyl phosphoribosyl transférase codée par le gène *UPRT*, la lactate déshydrogénase codée par le gène *LDH*, l'ADN polymérase codée par le gène *POL* et la nucléoside triphosphatase codée par le gène *NTP*. Cette dernière est présente en très grande quantité dans le cytosol et représente 5% des protéines totales (Fortier et Dubremetz 1993). Cette enzyme est sécrétée par *T. gondii* dans la vacuole parasitophore après invasion de la cellule hôte (Asai et coll. 1995).

4-1-4 Autres protéines

Il s'agit pour les principales de protéines internes comme l'actine, la calmoduline, la tubuline et la myosine ou de protéines de stress (Heat Shock Protein de 70 kDa).

4-2 Mise en évidence d'une diversité antigénique

Les premiers à démontrer la présence de variations dans les déterminants antigéniques majeurs de 3 souches différentes de *T.gondii* furent Ware et Kasper (1987). Ces derniers ont montré que des anticorps monoclonaux initialement dirigés contre l'antigène P22 de toxoplasmes de la souche RH pour les tuer en présence de complément, ne tuent pas les toxoplasmes des souches C et P dans les mêmes conditions. De même après immunoblot IgM de ces 3 souches, les auteurs ont montré qu'il existait une forte réponse IgM anti P30 avec les antisérums correspondant aux souches P et C, alors que cette réponse IgM anti P30 était négative avec l'antisérum obtenu avec RH.

Mais c'est l'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques d'un seul épitope qui a permis de déceler des différences antigéniques entre les souches.

On peut, avec des anticorps monoclonaux, différencier les isolats en **deux groupes** : les virulents et les avirulents pour la souris.

- Bohne et coll. (1993) ont élaboré un anticorps monoclonal désigné Mab TB6G5 reconnaissant un antigène de 27 kiloDaltons d'origine cytoplasmique produit par les bradyzoïtes et les tachyzoïtes de 8 isolats avirulents pour la souris. En revanche, aucune réactivité n'a été observée avec 2 souches de référence virulentes pour la souris : RH et BK.

- De même, Meisel et coll. (1996) ont montré à partir de sept isolats (3 virulents pour la souris et 4 avirulents) qu'il existait deux formes antigéniquement différentes de GRA4 : l'anticorps Mab Tx34.31 ne réagit, après western-blot sur lysats de toxoplasmes, qu'avec les antigènes GRA4 des isolats virulents pour la souris.

D'autres auteurs ont montré qu'il existait **3 grands groupes** d'isolats en fonction de leur virulence chez la souris et de leur réactivité avec d'autres anticorps monoclonaux :

- Parmley et coll. (1994), à partir de 25 souches de *T.gondii* (4 virulentes et 21 avirulentes pour la souris), ont réalisé des immunoblots avec 4 anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes différents de l'antigène majeur de surface P22. En fonction des résultats, 3 groupes sont individualisés :

- 1 groupe de 4 souches virulentes reconnues par les 4 anticorps
- 1 groupe de 8 souches avirulentes reconnues également par les 4 anticorps
- 1 groupe de 13 souches avirulentes non reconnues par les 4 anticorps monoclonaux, mais reconnus par un anticorps polyclonal anti P22 (suggérant une forme modifiée de l'antigène P22 dans ce groupe).

- Jensen et coll. (1998) ont élaboré 4 anticorps monoclonaux à partir de l'isolat danois SSI 119 qui donc reconnaissent cet isolat, mais dont aucun ne reconnaît la souche RH. En combinant les réactivités de ces 4 anticorps monoclonaux avec 6 isolats (dont 2 virulents pour la souris), on observe également 3 groupes principaux.

5- La diversité génétique

5-1 Génome de *T.gondii*

Le génome de *T.gondii* est **haploïde** chez les hôtes intermédiaires, aux stades **tachyzoïtes** et **bradyzoïtes**. La multiplication est uniquement asexuée par mitoses. Dans les cellules épithéliales intestinales de l'hôte définitif (félinés), se produit une multiplication sexuée génératrice d'**oocystes diploïdes**. Après excrétion avec les fèces dans le milieu extérieur, il se produit une méiose réductionnelle lors de la sporulation, qui aboutit à la formation de 8 **sporozoïtes haploïdes**.

Par électrophorèse en champ pulsé, Sibley et Boothroyd (1992b) ont réussi à construire un caryotype moléculaire à partir de tachyzoïtes de *T.gondii*. Si le nombre exact de chromosomes n'est pas connu, ces auteurs ont réussi à individualiser au moins 10 chromosomes dont la taille varie de 2 Mb jusqu'à plus de 6 Mb.

Le toxoplasme possède trois types d'ADN :

- Un ADN nucléaire estimé par cytofluorométrie à 80Mb.
- Un ADN mitochondrial circulaire, formé de 36 000 paires de bases (Fortier et Dubremetz 1993).

- Un ADN contenu dans un plastide, organe acquis par endosymbiose secondaire d'une algue verte, spécifique des Apicomplexa : l'apicoplaste.

La fonction de l'apicoplaste demeure inconnue. Son génome est constitué par de l'ADN circulaire de 35Kb (34 944 pb exactement, numéro d'accèsion GenBank® U87145). Le blocage de la réplication de son ADN par des inhibiteurs des ADN gyrases procaryotes, comme les fluoroquinolones, est létal pour *T.gondii* (Fichera et Roos 1997).

5-1-1 Gènes

Les séquences de nombreux **gènes** dont la fonction codante est connue ou inconnue, à copie unique ou multiple ont été caractérisées et répertoriées dans GenBank®.

La localisation de certains de ces gènes sur les différents chromosomes a été possible par hybridation avec des sondes spécifiques de ces gènes sur les chromosomes séparés par électrophorèse en champ pulsé (Sibley et Boothroyd 1992b). Parmi les gènes séquencés, certains, répertoriés dans le tableau 1, ont un polymorphisme allélique utilisé pour apprécier la diversité génétique de *T.gondii*.

Nom	Fonction codante	Copie	Ch	Référence
SAG 1	Antigène majeur de surface P30 (SAG1)	unique	VIII	Burg et coll. (1988)
SAG2	Antigène majeur de surface P22 (SAG2)	unique	VIII	Prince et coll. (1990)
ROP 1	Antigène de rhoptrie P60	unique	VIII	Ossorio et coll. (1992)
GRA 4	Antigène de granules denses P40	unique	?	Mevelec et coll. (1992)
NTP	Nucléoside triphosphatase I et II	unique	?	Asai et coll. (1995)
TUB 2	Sous unité β de la tubuline (b β -tubuline)	unique	IX	Nagel et Boothroyd (1988)
POL 1	ADN Polymérase alpha	unique	?	Binas et Johnson (1998)
850	inconnue	unique	V	Sibley et Boothroyd (1992a)
950			VI	
226			IV	
62			IX	
L328			VII	
C19			X	
BS	inconnue	multiple	?	
TGR1E	inconnue	multiple	?	Cristina et coll. (1991)

marqueurs génétiques sélectionnés par des sondes d'ADN

Ch : chromosome

Tableau 1 : loci utilisés pour le typage génétique de *T.gondii*.

Deux gènes nous ont plus particulièrement intéressés, car leur séquence contenait des microsatellites : il s'agit du gène codant pour la b β -tubuline et celui codant pour la myosine A.

Les gènes codant pour l'alpha-tubuline (*TUB 1*) et la bêta-tubuline (*TUB 2*) de *T. gondii* ont été séquencés et caractérisés par Nagel et Boothroyd (1988). Il n'y a qu'une seule copie de *TUB 1* et de *TUB2* dans tout le génome du toxoplasme. *Toxoplasma gondii* est le seul, parmi les organismes dont les gènes de la tubuline ont été étudiés, qui ait une copie unique des gènes codant pour la sous-unité alpha et pour la sous-unité bêta. Ces deux gènes contiennent de multiples introns (ou séquences non codantes), ce qui est également assez inhabituel dans les gènes des protozoaires parasites. Le gène de la bêta-tubuline contient 4 exons et 3 introns. Les deux sous-unités de la tubuline, l' α -tubuline et la β -tubuline, en copolymérisant forment les **microtubules**. Ces microtubules sont retrouvés dans les centrioles, les fuseaux mitotiques et méiotiques, le cytosquelette, les flagelles des gamètes mâles et peut être dans le conoïde de *T. gondii* (Nagel et Boothroyd 1988). Ils ont un rôle dans le transport et la sécrétion intracellulaires, l'architecture cellulaire et la motilité du parasite (Nagel et Boothroyd 1988).

Il existe 4 types de myosine exprimées par *T.gondii*, chaque type étant codé par un gène différent. Il s'agit pour les trois premiers des myosines A, B et C (respectivement *TgM-A*, *TgM-B* et *TgM-C*) dont les gènes ont été séquencés par Heintzelman et Schwartzman (1997). Une quatrième myosine dite myosine D (*TgM-D*) dont le gène a été récemment séquencé et soumis dans GenBank® par C. Hettmann, Heidelberg, Allemagne. Le gène codant pour la myosine A contient deux introns et 3 exons. Parmi les différents types de myosine retrouvés chez *T. gondii*, la myosine A ou *TgM-A* est la plus étudiée. C'est la seule qui soit abondamment exprimée dans les tachyzoïtes de *T. gondii* (Dobrowolski et coll. 1997). Les études d'immunolocalisation indiquent que la *TgM-A* est concentrée à l'extrémité apicale du parasite (Heintzelman et Schwartzman 1999). Le rôle de la *TgM-A* serait de potentialiser les mouvements de glissement, processus essentiel de l'invasion cellulaire par *T.gondii* (Dobrowolski et coll. 1997).

5-1-2 Expressed Sequence Tags (EST)

L'avancée la plus spectaculaire et la plus précieuse dans la connaissance du génome du toxoplasme a été réalisée grâce aux Expressed Sequence Tags ou EST. Le principe est de disposer de nombreuses séquences d'ADN courtes obtenues à partir de l'ARN messager du parasite, il s'agit donc uniquement, comme le nom l'indique, de séquences exprimées.

Les premiers EST toxoplasmiques ont été réalisés à partir des tachyzoïtes de la souche RH (Wan et coll. 1996). L'ARNm est d'abord isolé, puis purifié à partir d'une culture cellulaire de tachyzoïtes et transformé en ADNc. Cet ADNc est ensuite cloné. Ces clones d'ADNc sont rassemblés au sein d'une banque. Des séquences d'ADNc sont amplifiées par PCR à partir de clones sélectionnés au hasard, puis séquencées semi-automatiquement (tous les clones ne sont pas séquençables).

Ajioka et coll. (1998) ont ainsi analysé quelques 7400 EST à partir de tachyzoïtes de la souche RH virulente pour la souris. Manger et coll. (1998) ont analysé, selon le même procédé, environ 2500 EST supplémentaires, mais à partir de bradyzoïtes contenus dans des kystes de la souche ME 49 avirulente pour la souris. Tous ces EST sont rassemblés au sein des dbEST de GenBank®, avec pour chaque EST un numéro d'accèsion GenBank® particulier.

L'intérêt de ces EST, outre de disposer très facilement d'innombrables séquences d'ADN du toxoplasme, est que l'on peut tenter de leur attribuer des fonctions. Il suffit, grâce au Basic Local Alignment Search Tool ou BLAST (Altschul et coll. 1990), de comparer leurs séquences nucléotidiques ou leur traduction en acides aminés avec celles de gènes dont la fonction est connue ou de protéines correspondantes d'autres organismes (Ajioka 1998). On a pu ainsi imputer des fonctions à plus de 500 EST dans la transcription, traduction, sécrétion de protéines, transduction de signaux, l'organisation du cytosquelette ou encore le métabolisme de *T. gondii* (Ajioka et coll. 1998). De la même façon, on a pu identifier des séquences chez *T. gondii* retrouvées uniquement chez les Apicomplexa et donc spécifiques de ce phylum (Ajioka et coll. 1998). Cependant, la grande majorité des EST de *T. gondii* correspondent à des gènes dont la fonction est inconnue.

5-2 Le typage génétique de *T. gondii* : méthodes et résultats

5-2-1 Analyse isoenzymatique

Largement utilisée pour typer de nombreux protozoaires, l'analyse isoenzymatique relève stricto sensu du phénotypage et non du génotypage, mais on peut la considérer comme étant une approche indirecte du génome.

Le typage des isolats de toxoplasmes fut réalisé successivement grâce à plusieurs études (Dardé et coll. 1988a, 1992; Dardé 1996, 1997; Bossi et coll.1998) avec pour principe de comparer les profils de migration en électrophorèse d'enzymes provenant de tachyzoïtes d'isolats de *T. gondii*. La technique utilisée est l'isoélectrofocalisation sur gels de polyacrylamide ultra-minces sauf pour la propionyl estérase dont l'isoélectrofocalisation fut faite sur gel d'agarose pour améliorer la résolution des bandes.

Parmi les systèmes enzymatiques étudiés, seulement 6 montrèrent des profils électrophorétiques ou profils isoenzymatiques différents en fonction des isolats (différences caractérisées par le nombre de bandes et/ou la valeur du point isoélectrique correspondant à ces bandes). Il s'agit de l'aspartate amino transférase (ASAT), la glutathione réductase (GSR), la glucose phosphate isomérase (GPI), l'amylase (AMY), la phosphatase acide (ACP) et la propionyl estérase (PE).

Pour chaque enzyme, deux ou trois profils électrophorétiques ou **types isoenzymatiques** sont observés (I, II ou III). En combinant les différents profils isoenzymatiques obtenus avec ces 6 enzymes, les 86 isolats typés par Dardé ML dans le laboratoire de Parasitologie du CHU Dupuytren à Limoges, peuvent être classés en 12 groupes distincts ou **zymodèmes (Z)** : Z1, Z2, Z3, Z4 et les zymodèmes 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12 qui sont constitués d'isolats uniques, comme on peut le voir dans le tableau 2.

La grande majorité des isolats typés peuvent être classés en trois groupes principaux : un groupe de zymodème 1, un groupe qui rassemble les zymodèmes proches 2 et 4, et un dernier groupe correspondant au zymodème 3. Le zymodème 1 est très homogène. Il ne regroupe que des isolats virulents pour la souris et est caractérisé par un type I dans chacun des six systèmes enzymatiques.

Les zymodèmes 4 et 8 sont en fait très proches du zymodème 2, car ils ne diffèrent de ce dernier que par un seul système enzymatique (GPI). De même, le zymodème 6 avec le zymodème 3. Les zymodèmes 9,10 et 11 se singularisent par un type III pour ACP.

	Z1	Z2	Z4	Z3	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
ASAT	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
GSR	I	II	II	II	I	II	I	II	I	I	II	I
GPI	I	I	III	II	I	I	II	II	II	II	II	I
AMY	I	I	I	II	II	II	II	I	II	I	I	II
ACP	I	I	I	I	II	I	II	I	III	III	III	I
PE	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I	II	II
Nombre d'isolats	19	37	8	14	1 MAS	1 RUB	1 CAST	1 TONT	1 SSI 119	1 P89	1 P80	1 VAND

Tableau 2 : association des différents types isoenzymatiques de 6 systèmes enzymatiques en 12 zymodèmes dans une population de 86 isolats.

5-2-2 RFLP et PCR-RFLP

Le principe général d'une PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) est, après extraction de l'ADN, d'amplifier par PCR un locus déterminé grâce à un couple d'amorces encadrant le locus en question. Ensuite, l'ADN amplifié est digéré par diverses enzymes de restriction. En fonction de la présence ou non d'un site de restriction sur l'ADN amplifié pour l'une ou l'autre de ces enzymes, on aura coupure ou non en fragments de longueurs différentes. Ce polymorphisme de longueur des fragments de restriction est apprécié après électrophorèse sur gel d'agarose ou par Southern blot. Pour ce qui est de la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), le principe est le même, sauf que l'on part de l'ADN génomique total sans PCR préalable.

Ces techniques étaient les plus utilisées, jusqu'à présent, pour apprécier le polymorphisme de l'ADN. On peut utiliser des loci à copies uniques ou à copies multiples. Le polymorphisme attendu dans le premier cas est faible, élevé dans le second.

5-2-2-1 Sur loci à copies uniques

En ce qui concerne le toxoplasme, les premiers à utiliser cette technique pour typer des isolats furent Sibley et Boothroyd (1992a) :

- Par **PCR-RFLP** sur loci à copie unique, ils étudièrent les profils de restriction de 28 isolats de toxoplasmes en utilisant les loci *SAG1* et *850*, après PCR, digestion par 3 enzymes de restriction et analyse par Southern-blot grâce à des sondes issues respectivement du locus *SAG1* et *850*. Dans les deux cas, quel que soit le site de restriction, le polymorphisme est biallélique.

Avec ***SAG1***, l'allèle de type 1 est caractéristique des isolats virulents, celui de type 2 n'est retrouvé que chez les isolats avirulents pour la souris.

En revanche, pour le locus ***850***, si l'allèle de type 2 n'est retrouvé que chez les isolats avirulents, l'allèle de type 1 est rencontré aussi bien chez des isolats avirulents que virulents pour la souris.

En combinant les génotypes obtenus avec *SAG1* et *850*, on pouvait classer également les 28 isolats en trois groupes principaux (bien que les auteurs ne l'aient pas fait).

- Les auteurs ont aussi réalisé une **RFLP** sur l'ADN génomique total sans PCR préalable, et ce, sur 11 isolats. Ils ont étudié, en plus des loci *SAG1* et *850*, 7 loci à copie unique génétiquement non liés entre eux : *SAG2*, *ROP1*, *950*, *226*, *62B*, *L328* et *C19*. Le polymorphisme retrouvé est biallélique, sauf pour *C19* (triallélique). Là encore, les auteurs constatent une remarquable homogénéité génétique au sein des 7 isolats virulents pour la souris. Les génotypes des isolats non virulents pour la souris sont en revanche distincts des précédents et montrent beaucoup plus d'hétérogénéité.

L'étude de référence est celle entreprise par Howe et Sibley (1995) sur 106 isolats. Six loci à copie unique indépendants les uns des autres ont été utilisés. Ils ont déjà été étudiés par Sibley et Boothroyd (1992a) : il s'agit des loci *SAG1*, *SAG2*, *ROP1*, *850*, *L328* et *62B*, mais cette fois ci, la technique utilisée est uniquement la PCR-RFLP. Le polymorphisme allélique retrouvé va de 3 à 4 allèles selon les loci. Sur les 1728 combinaisons possibles entre les allèles des 6 loci, seulement 15 génotypes différents ont été retrouvés.

L'immense majorité des isolats appartient à 3 génotypes particuliers ou à divers génotypes très proches de ces 3 génotypes : **type I**, **type II** et **type III**. Le type I ne comprend que des isolats virulents, les types II et III des isolats avirulents pour la souris. Seuls 4 isolats ont été considérés comme recombinants :

- 3 dérivent d'une recombinaison entre le type II et III.
- 1 dérive d'une recombinaison entre le type I et le type III : il s'agit d'un isolat que nous avons également étudié : P89.

5-2-2-2 Sur loci à copies multiples

Les techniques précédentes du fait de leur faible polymorphisme ne permettent de classer les souches qu'en groupes, mais non d'individualiser chaque souche par un génotype particulier.

Cette empreinte digitale par l'ADN (DNA finger-printing) pourrait identifier sans ambiguïté une souche particulière à l'origine d'épidémies humaines ou animales, ou mettre en évidence une contamination par une autre souche de laboratoire.

Parmi les loci à copies multiples pouvant être utilisés dans ce but, il existe une famille d'éléments répétés et dispersés dans le génome de *T.gondii* reconnue par la sonde **BS**. Cette sonde **BS** est un fragment d'ADN de 800 pb issu de la digestion par PstI de l'ADN génomique de la souche RH.

Sibley et Boothroyd (1992a) l'ont utilisée pour typer par **RFLP** des isolats de *T.gondii* (Southern-blot de l'ADN génomique digéré par MspI et hybridé par la sonde BS radiomarquée, puis révélation par autoradiographie). En partant de l'ADN génomique total de 11 souches (7 virulentes, 4 avirulentes pour la souris), le polymorphisme est maximal, chaque souche ayant son propre profil (sauf deux souches aux profils identiques, mais provenant de la même région et pouvant être épidémiologiquement liées). En revanche, par **PCR-RFLP** sur le gène BS de 28 souches, les auteurs retrouvent beaucoup moins de polymorphisme avec notamment un profil unique et caractéristique corrélé à la virulence pour la souris puisque retrouvé chez toutes les souches virulentes et uniquement chez elles.

Howe et Sibley (1994) ont montré grâce à cette sonde *BS* qu'il existait une hétérogénéité génétique au sein de la souche RH.

Mais ce sont Messina et coll. (1996) qui ont séquencé cette sonde *BS* et montré qu'elle était constituée d'un trinuécléotide *GAA* répété en tandem 90 fois, ce qui constitue donc typiquement un microsatellite. Le nombre très important de répétitions du motif de base détecté pour la souche RH laisse deviner un polymorphisme très important au sein des autres souches de *T.gondii* (chaque souche ayant un nombre différent de répétitions du motif de base), d'autant plus que ces microsatellites sont répétés au sein du génome. Messina et coll. (1996) ont réalisé une RFLP, comme Sibley et Boothroyd (1992a) mais avec une enzyme de restriction différente, et ont mis en évidence un profil caractéristique de chaque souche étudiée (différentes bandes de longueurs variables). De plus, ces auteurs ont détecté des bandes communes pour des souches de même groupe, permettant de regrouper ces souches dans les 3 groupes définis en type I, II et III par Howe et Sibley (1995).

D'autres familles de séquences d'ADN répété, comme celles reconnues par une famille de sondes dites *TGR*, ont été décrites chez *T.gondii* par Cristina et coll. (1991). Ces derniers ont utilisé la plus conservée et la plus répétée de ces sondes, *TGR1E*, pour typer par RFLP 10 souches de *T.gondii* (Southern-blot de l'ADN génomique des souches digéré par *SaII* suivi d'une hybridation avec la sonde *TGRE1* radiomarquée, puis révélation par autoradiographie). Cette sonde *TGR1E* semble détecter un polymorphisme moindre qu'avec le gène *BS*, puisque sur les 7 souches appartenant au type II PCR-RFLP de Howe et Sibley (1995), 3 ont un profil identique.

5-2-3 RAPD

Guo et coll. (1997) ont amplifié 35 isolats de *T. gondii* par RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA) avec 18 amorces choisies au hasard. Parmi celles ci, 4 ont donné des profils RAPD capables de discerner les génotypes correspondant aux isolats virulents pour la souris, des génotypes correspondant aux isolats avirulents.

5-2-4 Typage par séquençage D'ADN ou D'ARN

5-2-4-1 *GRA4*

Meisel et coll. (1996) ont amplifié par PCR et séquencé un fragment de 376 paires de bases du gène codant pour *GRA4*.

Deux types de séquences ont été individualisés : l'un correspondant aux isolats avirulents pour la souris et l'autre aux isolats virulents pour la souris. La différence entre les deux séquences se situe au niveau de 6 nucléotides entraînant des substitutions en acides aminés d'une séquence à l'autre (dont 2 dans la région codant pour l'épitope reconnaissant l'anticorps Tx34.31). Ainsi, il existe 2 allèles dans le locus *GRA4* de *T. gondii*. Ces allèles donnent 2 formes de l'antigène *GRA4* avec une seule forme détectable par l'anticorps MAb Tx34.31. Une seule substitution d'acide aminé dans l'épitope cause l'exclusive réactivité de TX34.31 avec les isolats virulents pour la souris.

Les deux allèles du gène codant pour *GRA4* sont donc corrélés à la virulence pour la souris pour un échantillonnage de 7 isolats de toxoplasmes.

5-2-4-2 *SAG1*

- Rinder et coll. (1995) ont amplifié par PCR une séquence de 315 paires de bases contenue dans la région 3' du gène *SAG1* à partir de 9 isolats de *T.gondii* (6 virulents et 3 avirulents pour la souris). Sur les 315 paires de bases, 98 appartiennent à la région codante et 217 à la région non codante du gène *SAG1*.

Les auteurs ont séquencé les produits PCR obtenus à partir des 9 isolats et les ont comparé à la séquence obtenue par Burg et coll. (1988) dans les mêmes conditions à partir d'une souche RH. Des nucléotides différents sont observés sur 5 positions de la séquence définissant ainsi 5 sites de polymorphisme (3 dans la région codante et 2 dans la région non codante) :

- 3 sites (2 dans la région codante, 1 dans la région non codante) sont complètement corrélés avec la virulence chez la souris. En effet, les 5 souches virulentes type Z1, mais aussi la souche virulente MAS (Z5) ont exactement la même séquence au niveau de ces 3 sites que la souche RH de Burg et coll.(1988). Les 3 souches avirulentes ont une séquence différente dans chacun de ces 3 sites toujours par rapport à la souche RH de Burg et coll. (1988).

- 1 site (dans la région codante) est corrélé avec la virulence chez la souris en ce qui concerne les souches type Z1. En revanche, la souche virulente MAS a au niveau de ce site la même séquence que les souches avirulentes pour la souris.

- 1 site (dans la région non codante) montre la présence d'une séquence différente chez la souche RH de Burg et coll. (1988) par rapport aux 9 souches étudiées par Rinder et coll. (1995).

- Windeck et Gross (1996) ont amplifié par PCR une séquence contenue dans la région 5' non traduite en amont du gène *SAG1* à partir de deux souches (une virulente et l'autre non virulente pour la souris). Le séquençage des 2 produits PCR obtenus et leur comparaison ont montré des différences de nucléotides sur 8 positions de la séquence. De plus, au sein de la séquence, il existe des séquences de 27 paires de bases répétées 5 fois pour la souche virulente et 4 fois pour la souche avirulente.

Les auteurs ont voulu savoir si ce nombre différent de répétitions avait une conséquence sur l'expression du gène *SAG1*. Après rétro-transcription de l'ARNm des tachyzoïtes de 2 souches virulentes et 2 avirulentes pour la souris en ADNc, amplification de cet ADNc par PCR semi quantitative, ils ont montré que les 2 souches virulentes pour la souris exprimaient des niveaux de transcription d'ARNm provenant du gène *SAG1* 4 fois supérieurs à ceux exprimés par les deux souches avirulentes pour la souris.

Ainsi la virulence chez la souris semble être associée au niveau d'expression du gène *SAG1*, lui même corrélé au nombre de répétitions d'une séquence de 27 paires de bases dans la région 5' non traduite en amont du gène *SAG1*, pour un échantillonnage de 4 isolats de toxoplasmes.

- Howe et coll. (1996) ont essayé d'identifier un marqueur génétique associé à la virulence pour la souris à partir de 3 isolats (2 de type III et un de type recombinant I / III) possédant l'allèle 1 pour *SAG1* en PCR-RFLP (comme les isolats virulents de type I), mais dont la virulence pour la souris diffère. En effet, un seul de ces 3 isolats (classé en type III) est virulent pour la souris.

Considérant que l'allèle 1 de *SAG1* n'est donc pas totalement corrélé avec la virulence pour la souris, contrairement à ce qui avait été décrit (Sibley et Boothroyd 1992a), ils ont cherché une séquence qui partage le même site de restriction entre les isolats de type I et cet isolat de type III, donc corrélé à la virulence pour la souris. Ils en ont trouvé une, **non codante, en amont du gène *SAG1*** sur le chromosome VIII. En effet, après PCR-RFLP sur ce site de restriction à partir de 39 isolats, ils montrent une corrélation forte de 38 isolats sur 39 avec la virulence pour la souris (l'isolat du zymodème 5 (MAS) virulent pour la souris, ne partage pas le site de restriction commun aux autres isolats virulents pour la souris).

5-2-4-3 *SAG2*

Parmley et coll. (1994), après avoir constaté des différences antigéniques entre souches avec 4 anticorps monoclonaux anti P22, ont réalisé un séquençage du gène *SAG2* codant pour l'antigène P22 ou *SAG2*, sur 10 isolats (1 virulent et 9 avirulents pour la souris) qui révèle 2 allèles après comparaison avec la séquence de la souche RH obtenue dans les mêmes conditions par Prince et coll. (1990) :

- 3 isolats (1 virulent et 2 avirulents) ont un allèle de type 1 identique à la souche RH.

- 7 isolats tous avirulents se différencient de la souche RH par 5 nucléotides substitués et l'insertion d'un triplet GGT qui définissent l'allèle de type 2.

Ces différences entraînent une substitution en acides aminés non reconnue par les 4 anticorps monoclonaux, ainsi que l'apparition ou la disparition de sites de restriction pour 4 enzymes de restriction autorisant une PCR-RFLP sur les isolats restants.

Au total, séquençage ou PCR-RFLP sur SAG2 permettent de classer 25 isolats en deux groupes selon leur type allélique SAG2 :

- les 12 isolats (4 virulents et 8 avirulents pour la souris) non reconnus par les 4 anticorps monoclonaux ont un allèle SAG2 de type 1.

- les 13 isolats avirulents pour la souris, non reconnus par les 4 anticorps monoclonaux ont un allèle SAG2 de type 2.

Howe et Sibley (1995) avec une PCR-RFLP sur le même gène SAG2 avaient retrouvé une corrélation entre type allélique de SAG2 et virulence pour la souris, mais les enzymes de restriction et les amorces de la PCR étaient différentes.

Ainsi la corrélation d'un marqueur (SAG2) à la virulence pour la souris est étroitement liée à la technique employée (Enzymes de restriction et amorces pour PCR différentes).

5-2-4-4 ADN polymérase alpha

Binas et Johnson (1998) ont amplifié par PCR le plus long des 3 introns contenus dans le gène codant pour la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase alpha à partir de 10 souches de *T.gondii* (6 virulentes et 4 avirulentes pour la souris).

Des différences ont été retrouvées après séquençage de produits PCR entre les souches avirulentes et virulentes pour la souris : les souches virulentes ont 2 nucléotides supplémentaires et des nucléotides différents au niveau de 14 positions par rapport à la séquence des souches avirulentes. Ces substitutions sont responsables de la présence d'un site de restriction pour l'enzyme de restriction NdeI uniquement dans l'intron des souches avirulentes, permettant de réaliser une PCR-RFLP avec cette enzyme et de différencier les isolats virulents pour la souris (une bande) des isolats avirulents (2 bandes).

Ainsi le polymorphisme biallélique retrouvé dans un intron du gène codant pour la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase alpha de *T.gondii* semble être associé à la virulence chez la souris pour leur échantillonnage de 10 isolats de toxoplasmes.

5-2-4-5 NTPase I et II

Asai et coll. (1995) ont montré que la nucléoside triphosphatase ou NTPase isolée chez des tachyzoïtes de la souche RH était un mélange de deux isoenzymes : NTPase I et NTPase II.

Après PCR et séquençage du gène codant pour cette enzyme chez une souche virulente (RH) et une avirulente pour la souris (BEV), les auteurs ont montré que la souche RH possédait les deux types isoenzymatiques (NTPase I et II), alors que la souche BEV n'en avait qu'un (NTPase II).

Des différences de nucléotides entre les séquences des gènes codant pour ces deux isoenzymes sont à l'origine d'un site de restriction pour BamHI uniquement pour NTPase II. Ainsi, par PCR-RFLP sur le gène codant pour la NTPase de 21 souches (10 virulentes et 11 avirulentes pour la souris), les auteurs ont montré la présence de trois bandes ou génotype 1 (correspondant aux NTPase I et II) chez 8 des 10 souches virulentes, et de deux bandes ou génotype 2 (NTPase II seule) chez toutes les souches avirulentes.

Ceci montre que seules les souches virulentes pour la souris expriment l'isoforme I de la NTPase, cette dernière serait donc corrélée à la virulence chez la souris pour leur échantillonnage de 21 isolats de toxoplasmes.

5-2-4-6 ssrRNA

Luton et coll. (1995) ont comparé les séquences des gènes codant pour l'ARN des petites sous-unités ribosomales (ssrRNA) de 9 isolats de *T.gondii* (6 virulents pour la souris, dont 4 stocks de la souche RH d'origines différentes, et 3 avirulents). Il existe une variation de séquence de 0,06%-1,04% entre les souches de *T.gondii*, ce qui est relativement faible comparé aux pourcentages de variation dans les séquences de gènes codant pour les ssrRNA d'autres parasites du phylum Apicomplexa comme *Cryptosporidium parvum* (entre 3% et 8%). Il n'y a pas de corrélation entre virulence pour la souris et variation de séquences chez les souches étudiées. Il semblerait même que des souches avirulentes pour la souris comme ME49 soient plus proches des souches RH que des autres souches avirulentes étudiées.

5-2-5 Caryotype moléculaire

Sibley et Boothroyd (1992b) ont montré des variations significatives de taille des chromosomes III, V et VI entre 3 souches différentes après migration et séparation des chromosomes par électrophorèse en champ pulsé.

5-2-6 Microsatellites du gène de la bêta-tubuline

Les premiers (et les seuls) à utiliser la technique des microsatellites pour typer les isolats de *T. gondii* furent Costa et coll. (1997). Leur étude porta sur 34 isolats de référence déjà typés en zymodèmes par Dardé (1996).

Ils utilisent le microsatellite dont le motif de base est le dinucléotide (TG)_n, contenu dans un intron du gène de la bêta-tubuline de *T. gondii*. Le polymorphisme de ce microsatellite parmi ces isolats a été évalué par PCR fluorescente et analysé avec un séquenceur automatique. Le polymorphisme retrouvé était biallélique :

- les 7 isolats de zymodème 1, tous virulents pour la souris donnèrent après amplification un produit de PCR de 129 paires de bases. Ceci correspond à un nombre de répétition du microsatellite (TG)_n égal à 8, soit (TG)₈.
- les 27 autres isolats de zymodème 2, 3 et 4 avirulents pour la souris donnèrent après amplification un produit de PCR de 127 paires de bases. Ceci correspond à un nombre de répétition du microsatellite (TG)_n égal à 7, soit (TG)₇.

Les auteurs concluent que le microsatellite (TG)_n contenu dans l'intron du gène de la bêta-tubuline de *T. gondii* distingue les isolats de zymodème 1 virulents pour la souris des autres qui sont avirulents pour la souris pour un échantillonnage de 34 isolats.

5-3 Limites du typage génétique de *T.gondii*

Les techniques, résumées dans le tableau 3, permettant de typer les isolats de *T. gondii* sont nombreuses et variées. Certaines ont des inconvénients d'ordre technique (grande quantité de tachyzoïtes nécessaires à l'analyse isoenzymatique, manque de reproductibilité pour la RAPD, utilisation de produits radiomarqués pour les sondes *BS* et *TGRE1*). De plus, elles ne sont pas toutes d'un intérêt égal.

D'abord, la majorité des études portent sur un échantillonnage trop restreint pour pouvoir tirer des conclusions en terme de génétique des populations. Seulement trois études échappent à cette critique (Howe et Sibley 1995; Dardé 1996, 1997; Costa et coll. 1997). Un faible échantillonnage peut faire douter de la validité des conclusions de ces travaux. Ainsi, la corrélation d'un marqueur génétique à la virulence chez la souris, but de la plupart de ces travaux comme on l'a vu, ne pourra être confirmé qu'après typage d'isolats supplémentaires. En particulier, il semble indispensable de typer des isolats génétiquement atypiques, comme les recombinants I / III et surtout les isolats virulents pour la souris appartenant aux zymodèmes 5, 6, 8 et 12 différents sur le plan génétique des isolats de zymodème 1 ou type I. Par exemple la corrélation à la virulence pour la souris en amont du gène *SAG1* sur le chromosome VIII (Howe et coll. 1996) n'est pas valable pour l'isolat virulent MAS de zymodème 5.

L'autre point faible de ces études réalisées sur un échantillonnage réduit, mais également de l'étude de Costa et coll. (1997), est de n'utiliser qu'un seul locus pour réaliser le typage génétique des isolats de *T. gondii*. Or un typage génétique doit toujours faire appel à plusieurs marqueurs génétiques indépendants, afin d'obtenir un génotype multilocus. A cet égard, seules les études de Dardé (1996, 1997) et Howe et Sibley (1995) en utilisant respectivement six systèmes enzymatiques et six loci indépendants respectent ce critère. C'est pourquoi par la suite, nous ne prendrons comme référence que ces deux études (en gris dans le tableau 3).

Un des points communs du typage génétique réalisé jusqu'à présent (mis à part sur loci à copies multiples), que ce soit par approche indirecte du génome comme l'analyse isoenzymatique, ou du génotypage par PCR-RFLP sur loci à copie unique, séquençage, RAPD ou microsatellite, est de montrer un **faible degré de polymorphisme**. En effet, le nombre d'allèles par locus ou de types enzymatiques par système enzymatique étudié varie seulement entre 2 et 4, comme on peut le voir dans le tableau 3.

Le polymorphisme des loci à copies uniques permet de séparer la population d'isolats typés en seulement deux ou trois groupes principaux (en combinant les types alléliques de plusieurs loci) et confirme donc la diversité antigénique démontrée par les anticorps monoclonaux. Ce faible polymorphisme est une limite pour certaines applications du typage génétique.

A l'inverse, avec des techniques utilisant des sondes (*BS* ou *TGRE1*) dirigées contre des loci à copies multiples, le polymorphisme allélique est tel, que l'on peut, pour chaque isolat, individualiser un génotype particulier, ce qui peut avoir des applications nombreuses que nous détaillerons par la suite. On peut aussi déceler pour chaque isolat des bandes caractéristiques permettant de les classer en trois groupes principaux (Messina et coll. 1996). Le problème de ces techniques est, comme on l'a vu, qu'elles utilisent des sondes radiomarquées.

Locus	Allèles	Isolats	Technique	Référence
SAG1	3	9	séquençage	Rinder et coll. (1995)
SAG1	3	106	RFLP-RFLP	Howe et Sibley (1995)
850	4			
ROP1	3			
L328	4			
62	4			
SAG2	3			
SAG2	2	25	Séquençage + PCR-RFLP	Parmley et coll. (1994)
GRA 4	2	7	Séquençage	Meisel et coll. (1996)
NTP	2	21	Séquençage + PCR-RFLP	Asai et coll. (1995)
POL 1	2	10	Séquençage + PCR-RFLP	Binas et Johnson (1998)
-	2	35	RAPD	Guo et coll. (1997)
TUB 2	2	71	Microsatellite	Costa et coll. (1997)
BS	-	11	RFLP	Sibley et Boothroyd (1992a)
TGRE1	-	10	RFLP	Cristina et coll. (1991)

Enzyme	Types	Isolats	Technique	Référence
ASAT	2	68	Analyse isoenzymatique	Dardé (1996, 1997)
GSR	2			
AMY	2			
GPI	3			
PE	2			
ACP	3			

Tableau 3 : caractéristiques des techniques de typage de *T. gondii*.

II- Les corrélations entre diversité génétique et diversité biologique

1- Clonalité

Les données fournies par les études principales, réalisées sur un grand nombre d'isolats, à partir de plusieurs marqueurs génétiques (Howe et Sibley 1995; Dardé 1996, 1997) ont été analysées en terme de génétique des populations et ont montré la structure clonale de *T.gondii*.

1-1 Critères de clonalité

Tibayrenc et coll. (1991) ont énuméré les critères en terme de génétique des populations permettant de savoir si un organisme a une reproduction clonale à partir de l'étude de génotypes multi-locus.

1-1-1 Sur-représentation d'un génotype multilocus particulier.

C'est le critère le plus souvent majeur de l'existence d'une reproduction clonale. Cet argument est renforcé quand un même génotype réapparaît en excès dans des localités variées, voire distantes ou à plusieurs années d'intervalle entre les isolements (Tibayrenc et coll. 1991). Les deux études ayant le plus d'échantillons confirment l'existence de ce critère chez *T.gondii*.

- Ainsi Howe et Sibley (1995), par PCR-RFLP sur 6 loci à copie unique indépendants montrent qu'il existe un génotype prédominant : le type II. Sur 106 isolats typés, 57 appartiennent au type II, soit 54%.

- Dardé (1996, 1997), par analyse isoenzymatique sur 6 systèmes enzymatiques différents, montre que le groupe constitué des zymodèmes proches Z2 et Z4 est largement prédominant : sur 68 isolats analysés, 40 appartiennent à ce groupe soit 59%.

Il apparaît également qu'un même génotype peut être isolé à des années d'intervalle, dans des endroits éloignés et même chez des hôtes très différents montrant ainsi une stabilité des génotypes multi-locus dans l'espace et le temps. Par exemple, l'analyse isoenzymatique de la souche ME49 isolée en 1965 aux USA chez un mouton et de la souche SZY isolée d'un placenta humain en 1988 à Limoges, montre qu'elles appartiennent toutes les deux au même zymodème 2 (Dardé 1996, 1997). Des exemples similaires sont retrouvés avec les autres zymodèmes principaux (Dardé 1996, 1997), mais également avec les 3 types PCR-RFLP (Howe et Sibley 1995).

1-1-2 Corrélation entre des marqueurs génétiques indépendants.

Des isolats identiques ont été typés par analyse enzymatique par Dardé (1996, 1997) et par PCR-RFLP par Howe et Sibley (1995) à partir de 12 marqueurs génétiques indépendants (6 systèmes enzymatiques et 6 loci indépendants). Il existe une corrélation étroite entre les types PCR-RFLP et les zymodèmes principaux : le type I équivaut au zymodème 1, le type II au zymodème 2 et 4 et le type III équivaut au zymodème 3.

Cette corrélation entre marqueurs génétiques indépendants témoigne de leur **transmission en bloc sans recombinaison**. Ainsi, on peut regrouper la majorité de la population de toxoplasmes étudiés à l'intérieur de ces 3 groupes génotypiques principaux.

1-1-3 Absence de nombreux génotypes recombinants possibles.

Howe et Sibley (1995) ont calculé qu'avec le nombre d'allèles retrouvés pour chacun des 6 loci et leur population de 106 isolats, le nombre de combinaisons différentes (c'est à dire le nombre de génotypes) était de **1728**. Or, ils ne retrouvent que **15** génotypes différents parmi les 106 isolats étudiés. Ainsi, 99% des génotypes recombinants possibles ne sont pas retrouvés parmi les 106 isolats étudiés. De plus, plus de 95% des isolats appartiennent ou sont apparentés à un des 3 génotypes majeurs définissant les 3 types I, II et III. Ceci montre que la plupart des isolats proviennent d'une expansion mitotique d'un nombre très limité de génotypes, et qu'en conséquence un grand nombre de génotypes recombinants possibles ne sont pas retrouvés dans la population étudiée (Sibley et Howe 1996).

On voit que *Toxoplasma gondii* par analyse isoenzymatique et typage PCR-RFLP à partir de 12 marqueurs génétiques indépendants sur plus de 160 isolats répond bien aux critères de multiplication clonale définis par Tibayrenc et coll. (1991). L'appartenance à ces critères définissant la clonalité ne peut être validé **que sur la base de tests statistiques**, comme ceux définis par Tibayrenc (1993), ou ceux légèrement modifiés de Tibayrenc (1998).

Howe et Sibley (1995) à partir de leur étude génétique ont validé statistiquement les critères de clonalité définis par Tibayrenc et coll. (1991) et posent le principe que *T. gondii* appartient à **3 lignées clonales : le type I, II et III**.

Cette multiplication clonale pourrait surprendre quand on sait que *T. gondii* possède une multiplication sexuée chez l'hôte définitif. En fait, la clonalité d'une population n'implique pas l'absence totale de sexualité dans cette population (Tibayrenc et coll. 1991). La clonalité d'une population signifie simplement que la recombinaison génétique, issue de la multiplication sexuée au cours de la méiose dans le cas de *T. gondii*, survient dans cette population mais, avec une fréquence bien moindre que celle qui serait observée s'il s'agissait d'une population panmictique (Sibley et Howe 1996).

Ainsi, les recombinaisons génétiques, témoins de la multiplication sexuée de *T. gondii* existent, mais elles sont rares. Howe et Sibley (1995) ont mis en évidence, parmi les 106 isolats étudiés, seulement 4 recombinaisons entre les 3 génotypes principaux : 3 sont des recombinants entre le type II et III, alors qu'un seul isolat provient d'une recombinaison entre le type I et III. Ces rares recombinaisons montrent en fait, que le mode de multiplication de *T. gondii* est essentiellement clonal, mais pas exclusivement. L'existence de ces isolats recombinants entre les 3 types démontre également que les 3 lignées clonales de *T. gondii* ne sont pas des espèces séparées (Sibley et Howe 1996).

Une autre notion importante concernant la clonalité, est qu'il peut exister des petites différences parmi les membres d'une même lignée clonale, par mutation par exemple, dans des lignées s'étant multiplié par mitoses successives (Sibley et Howe 1996). Ces différences sont d'ailleurs bien mises en évidence par l'utilisation de marqueurs génétiques multi-copies comme la sonde *BS* (Howe et Sibley 1994) ou la sonde *TGRE1* (Cristina et coll. 1991).

1-2 Explications biologiques de la clonalité

Cette prépondérance d'une multiplication clonale peut s'expliquer avec un parasite comme *T.gondii*.

Si l'on considère son cycle, on imagine aisément que dans la nature, c'est le cycle indirect entre les innombrables hôtes intermédiaires, qui est le principal mode de multiplication de *T. gondii*. Cette transmission par carnivorisme shunte la multiplication sexuée, donc les recombinaisons génétiques, et propage ainsi uniquement les formes à division mitotique (Sibley et Howe 1996). De plus chez les félidés, la multiplication sexuée n'implique pas forcément l'échange de matériel génétique différent ou fertilisation croisée.

En effet, il semble que l'immunité acquise après une primo-infection toxoplasmique, aussi bien chez le chat que chez l'hôte intermédiaire, protège contre toute infection ultérieure. L'hôte définitif n'hébergeant qu'une souche de toxoplasme, donc un seul génotype, la reproduction sexuée ne pourra se faire que par **auto-fertilisation**. Ceci veut dire qu'il y a bien fusion entre gamètes mâles et femelles, mais génétiquement identiques. Il n'y a donc aucune recombinaison génétique, d'où l'expansion clonale. Ainsi, pour qu'il y ait recombinaison génétique entre deux souches différentes, il faudrait que le chat soit co-infecté par ces deux souches pendant la courte période au cours de laquelle sont produits les oocystes, en moyenne 5 à 15 jours après l'infection primaire (Sibley et Howe 1996).

On ne connaît pas la fréquence de ces infections mixtes simultanées dans la nature. On peut les réaliser expérimentalement avec obtention de génotypes recombinants, mais elles semblent rares dans la nature (Howe et Sibley 1995). De plus ces génotypes recombinants, même s'ils existent, ne sont pas forcément viables.

2- Propriétés biologiques

2-1 Virulence chez la souris

Il existe une relation très forte entre une caractéristique biologique comme la virulence d'un isolat pour la souris et l'appartenance de cet isolat à une des trois lignées clonales :

- les isolats entraînant une toxoplasmose **chronique** chez la souris appartiennent à **la lignée clonale de type II ou Z2 et Z4**, ceux qui donnent une toxoplasmose subaiguë à la lignée clonale de type III ou Z3.
- une toxoplasmose **aiguë** chez la souris est une caractéristique des isolats de **type I ou zymodème 1**, mais aussi d'isolats appartenant à des zymodèmes atypiques et uniques : **Z5, Z6, Z8 et Z12**.

2-2 Oocystogénèse chez le chat.

Dardé et coll. (1992) n'ont jamais réussi à obtenir d'oocystes chez le chat pour les isolats de zymodème 1 (sauf pour un isolat, mais en quantité réduite), alors qu'avec les isolats des deux autres lignées clonales, on obtient des oocystes très facilement après ingestion de kystes par le chat.

2-3 Vitesse de multiplication en culture cellulaire.

Une autre particularité biologique des isolats appartenant à la lignée clonale de type I par rapport aux autres lignées clonales II et III, est que les premiers se multiplient en culture cellulaire in vitro beaucoup plus rapidement que les seconds.

Makioka et Ohtomo (1995) ont montré que la souche virulente RH avait une activité ADN-polymérase 2,5 fois plus importante que la souche avirulente ME49, ce qui contribuerait en partie à la plus grande vitesse de multiplication des isolats de la lignée clonale de type I.

3- Répartition géographique

La très grande majorité des isolats typés génétiquement proviennent soit des USA (Howe et Sibley 1995), soit d'Europe, plus particulièrement de France (Dardé 1996, 1997; Howe et coll. 1997; Costa et coll. 1997). Le nombre d'isolats provenant d'autres pays ou d'autres continents est très faible : Dardé (1996, 1997) et Bossi et coll. (1998) ont pu typer 6 isolats de différents pays d'Amérique du sud. Howe et Sibley (1995) ont pu typer 3 isolats du Japon, 1 d'Australie, 3 d'Amérique centrale et 2 d'Amérique du sud. On voit donc qu'en dehors de l'Amérique du nord et de l'Europe, les rares autres isolats de *T.gondii* proviennent essentiellement d'Amérique du sud. Le reste de la planète est complètement écarté. Ceci introduit le **1er biais d'échantillonnage** : les isolats typés ne représentent absolument pas la population de toxoplasmes circulant dans le monde (Dardé 1997).

Ce biais mis à part, on constate que les 3 génotypes principaux sont largement répartis à la surface du globe sans spécificité géographique (Dardé 1996). On trouve, en effet, des isolats de type I, II ou III ou leurs équivalents en zymodèmes aussi bien en France, qu'aux USA, voire dans le reste du globe (Howe et Sibley 1995; Dardé 1996, 1997). Les échanges de viande et d'animaux entre ces différents pays pourrait expliquer la présence d'une même lignée clonale dans différentes régions du monde (Dardé 1996).

Mais, on ne peut écarter l'existence de génotypes différents n'appartenant pas à une des 3 lignées clonales notamment dans des régions densément peuplées comme l'Afrique, l'Inde ou la Chine où l'on dispose de très peu d'isolats pour les analyser génétiquement.

A l'inverse, des régions très faiblement peuplées, où prédomine le cycle sauvage de *T.gondii* dans lequel l'homme est quasiment absent, hébergent très certainement des génotypes différents de ceux représentant les trois lignées clonales. Ceux-ci sont suspectés par l'appartenance à des zymodèmes atypiques de deux isolats obtenus en Guyane Française (Bossi et coll. 1998; Dardé et coll. 1998).

Mises à part ces réserves, il n'y a aucun argument pour dire que les trois lignées clonales sont géographiquement séparées (Sibley et Howe 1996).

4- Toxoplasmoses humaines

Le problème du typage des isolats provenant de toxoplasmoses humaines est qu'ils proviennent uniquement de toxoplasmoses **symptomatiques** (toxoplasmoses congénitales, toxoplasmoses acquises chez des immunodéprimés et chez des immunocompétents avec lymphadénopathie ou une symptomatologie bruyante). En effet, on ne peut isoler la majorité des toxoplasmes rencontrés chez l'homme car ils l'infectent la plupart du temps de manière totalement asymptomatique. Ceci représente le **deuxième biais d'échantillonnage** dans le typage des isolats de *T. gondii*.

En outre, s'ajoute un **troisième biais d'échantillonnage** avec la sélection pour analyse génétique d'isolats virulents pour la souris de type I en PCR-RFLP ou Z1. En effet ces derniers sont excessivement rares dans la nature, et leur isolement dans des cas de toxoplasmose humaine constitue une priorité pour le typage génétique. Ainsi Dardé (1996, 1997) a typé par analyse isoenzymatique 9 isolats virulents pour la souris de zymodème 1 d'origine humaine provenant de divers laboratoires français, ce qui représente la quasi totalité des isolats de ce zymodème isolés en France ces dix dernières années en comparaison avec des centaines d'isolats avirulents pour la souris.

Howe et Sibley (1995) ont montré une corrélation entre certains génotypes et la toxoplasmose humaine : en effet les 2/3 des cas de toxoplasmose humaine appartiennent au type II. Les isolats de type II sont plus souvent associés à des réactivations d'infections chroniques (65% des cas de toxoplasmoses chez des sidéens appartiennent au type II), alors que les isolats de type I sont plus souvent associés à des cas de toxoplasmoses congénitales humaines (sur 41 isolats, 27% étaient de type I contre 59% de type II).

Dans une étude ultérieure par Howe et coll. (1997), une analyse de 68 isolats a été effectuée par PCR-RFLP sur le seul locus SAG2 directement à partir de prélèvements pathologiques. Sur les 45 échantillons de patients sidéens, 34 (soit 76%) contenaient un isolat de type II. Sur les 10 échantillons de patients immunodéprimés non sidéens, 8 (soit 80%) contenaient un isolat de type II. Enfin sur les 10 liquides amniotiques prélevés lors de toxoplasmose congénitale, 10 (soit 100%) contenaient un isolat de type II. Cette étude a montré encore une fois que les isolats de type II sont le plus souvent associés aux cas de toxoplasmose humaine. En revanche, l'absence d'isolats de type I dans les 10 cas de toxoplasmose congénitale va à l'encontre des résultats de Howe et Sibley (1995).

On peut éventuellement expliquer cette différence par le troisième biais d'échantillonnage décrit plus haut.

Costa et coll. (1997), grâce au polymorphisme du microsatellite contenu dans le gène de la bêta-tubuline, ont typé 37 isolats directement à partir de liquides amniotiques prélevés lors de toxoplasmoses congénitales. Tous les isolats avaient un profil microsatellitaire (TG)7 qui correspond à la fois au type II et III (ou encore Z2, Z3 et Z4). Aucun des isolats n'avait donc le profil microsatellitaire (TG)8 typique des isolats de type I ou Z1. Là encore les résultats sont discordants avec ceux de Howe et Sibley (1995) et confirment le biais d'échantillonnage.

En effet, Howe et coll. (1997) et Costa et coll. (1997) typent des isolats à partir de prélèvements pathologiques. Howe et Sibley (1995) ou Dardé (1996, 1997) ont réalisé leurs études à partir d'isolats récupérés dans le monde entier et centralisés dans leurs laboratoires. Les isolats de type I ou Z1 étant rares, donc précieux, ces derniers sont envoyés en priorité à ces laboratoires de référence expliquant la surabondance de ce type d'isolats dans l'échantillonnage de ces auteurs.

5- Toxoplasmoses animales

Les isolats d'origine animale soumis au typage génétique ont deux points communs qui introduisent le **4ème biais d'échantillonnage**. En effet, les études portent sur des isolats provenant presque exclusivement de seulement trois hôtes animaux : le mouton, le porc et le chat. Ceci ne reflète absolument pas la circulation du toxoplasme dans la nature où tous les homéothermes sont impliqués dans le cycle du toxoplasme comme hôtes intermédiaires. De plus, la majorité des études portent sur des isolats provenant de carcasses d'animaux, récupérés dans des abattoirs et ayant une toxoplasmose chronique sans signe patent d'infection. Rares sont les études visant à typer des isolats provenant de cas de maladies animales.

Il est admis que la majorité des infections humaines acquises après la naissance ont pour origine des infections animales via la consommation, soit d'aliments ou d'eau contaminés par des oocystes présents dans les selles de chats infectés, soit de viande insuffisamment cuite contenant des kystes de *T. gondii* (Dubey et Beattie 1988).

Il a été montré, qu'en France notamment, c'est l'ingestion de kystes tissulaires dans la viande infectée qui est la source principale d'infection. Les viandes incriminées sont principalement le porc aux Etats-Unis et le mouton en Europe.

Il semble donc intéressant de génotyper les isolats d'origine animale pour voir s'il existe un génotype prédominant ou un génotype spécifique de telle ou telle espèce animale, et de comparer ces résultats avec ceux d'origine humaine.

Toutes les études (Howe et Sibley 1995; Dardé 1996, 1997; Mondragon et coll. 1998; Owen et Trees 1999) montrent qu'aucun des trois génotypes principaux n'est spécifique d'une espèce animale donnée. Mis à part le type I très rarement isolé chez l'animal, on trouve des types II et III aussi bien chez le porc que le mouton ou le chat (animaux dont l'échantillonnage est représentatif).

Howe et Sibley (1995), à partir de leur analyse par PCR-RFLP avec 6 loci indépendants sur 34 stocks provenant d'infections chroniques d'animaux domestiques et sauvages, montrent une égale distribution entre les types II et III (47% de type III et 44% de type II). Mais dans la plupart des études, on retrouve comme en pathologie humaine, une grande majorité de type II (PCR-RFLP sur SAG2 uniquement) en génotypant les isolats d'origine animale.

Ainsi Owen et Trees (1999) retrouvent 100% de type II parmi l'échantillonnage étudié comprenant :

- 13 placentas de brebis ayant avorté. Ces brebis provenaient de 10 fermes différentes dans le nord-est de l'Angleterre et le nord du pays de Galles.
- 2 cerveaux de rongeurs sauvages capturés dans une de ces 10 fermes.
- 2 isolats extraits de cerveaux de souris inoculées avec des coeurs d'agneaux infectés mais asymptomatiques (récupérés dans des abattoirs).

Malgré le faible échantillonnage, cette étude est intéressante car la majorité des isolats proviennent de cas de maladies animales.

Mondragon et coll. (1998) ont génotypé 43 isolats (par PCR-RFLP sur SAG1 et SAG2) mais à partir de coeurs de porcs infectés chroniquement, prélevés dans un abattoir de l'Iowa par Dubey et coll. (1995). Contrairement à l'étude de Owen et Trees (1999) qui ont amplifié l'ADN directement à partir des tissus, les auteurs ont d'abord isolé les toxoplasmes par inoculation des coeurs de porcs à des souris ou ingestion par des chats. Là encore, le type II est majoritaire (36 sur 43 isolats soit 83,7%). Le reste des isolats appartient au type III (7 sur 43 isolats soit 16,3%). Si aucun isolat de type I n'a été retrouvé, on peut toutefois noter que parmi les 7 isolats classés en type III, 3 sont en fait des recombinants entre le type I et le type III (dont l'isolat P89 que nous avons également typé).

Ces deux dernières études montrent que les isolats de type II, à l'origine de la plupart des cas de toxoplasmoses humaines symptomatiques, sont aussi les plus fréquemment rencontrés dans les toxoplasmoses animales (moutons et porcs en particulier) aussi bien chroniques qu'à l'origine de maladies. La sur-représentation des types III dans la population animale de Howe et Sibley (1995) semble due à un biais d'échantillonnage, leur population d'isolats d'origine animale ne reflétant absolument pas la réalité comme les deux études précédentes, mais correspond à une accumulation d'isolats, pour typage génétique, venant d'horizons divers, sélectionnant les types I et III par rapport aux types II.

Ainsi, la plus grande fréquence de type II en pathologie humaine ne serait pas due à une plus grande pathogénicité du type II, mais tout simplement à une plus grande prévalence de ce type II dans la nature et en particulier chez les animaux dont la viande infectée est consommée par l'homme.

III- Les microsatellites

Dans l'étude du polymorphisme de l'ADN, l'outil le plus récent est celui qui fait appel aux microsatellites permettant de détecter un polymorphisme de répétition.

Il s'agit au sein du génome de répétitions en tandem où le motif de base est très court : 1 à 4 nucléotides (Kaplan et Delpech 1993). On les appelle aussi les **STR** (Short Tandem Repeats). On ne doit pas les confondre avec d'autres marqueurs appartenant au polymorphisme de répétition : les **minisatellites**. Chez ces derniers, il s'agit également de répétitions en tandem au sein du génome, mais le motif de base est plus long (supérieur à 10 nucléotides). On parle de **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats) pour les minisatellites. Les microsatellites sont uniformément distribués dans le génome (contrairement aux minisatellites plus abondants dans les régions télomériques). Ils ont un polymorphisme allélique élevé (ils sont dits informatifs), d'autant plus grand que le microsatellite est long (Kaplan et Delpech 1993). On considère qu'un marqueur microsatellite chez l'homme est polymorphe quand le nombre de répétitions en tandem du motif de base dinucléotidique est supérieur à 12 (Weber 1990).

Les motifs de base des microsatellites peuvent donc être constitués :

- d'un nucléotide : exemple T(n) ou A(n).
- de deux nucléotides : les plus fréquents et les plus étudiés sont **(CA)n** (équivalent à (AC)n, (GT)n ou (TG)n) qui sont les plus abondants des microsatellites. On en trouve, chez l'homme, un tous les 25 à 100 kb d'ADN génomique. On peut également rencontrer des répétitions des nucléotides (CT)n, (CG)n et (TA)n.
- de trois nucléotides : les plus fréquents sont (TTA)n, (AAT)n, (AGC)n et (TCG)n : on en rencontre un tous les 300 à 500 kb d'ADN génomique chez l'homme (Kaplan et Delpech 1993).
- de quatre nucléotides : (AATC)n, (TTAG)n, (AATG)n, (TTAC)n, (AAAT)n, (AAAT)n, etc...

Weber (1990) distingue les microsatellites parfaits des imparfaits :

- On parle de microsatellites **parfaits** quand il n'y a pas d'interruptions dans les répétitions du motif de base et que les séquences adjacentes ne sont pas constituées d'un autre motif répété, comme par exemple :

5' ACAGGCATCAACACACACACACACACCACAAAGTGC 3'

- Les microsatellites **imparfaits** sont constitués de 2 ou plus répétitions sans interruptions du motif de base, séparées par un maximum de 3 bases consécutives non répétées, comme par exemple :

5'CTTTCTCAGGA(CA)₈GAG(AC)₁₄AGGCAATGACA 3'

Le polymorphisme des microsatellites imparfaits montre une plus faible informativité que celle attendue en se basant sur le nombre total de répétitions (Weber 1990).

C'est l'avènement de la PCR mise au point en 1985 par K. Mullis de l'équipe de H.Erlich (laboratoires Cetus) qui a permis dès 1989 de mettre en évidence le polymorphisme des microsatellites (Litt et Luty 1989; Tautz 1989; Weber et May 1989). En effet, si on utilise un couple d'amorces oligonucléotidiques dont les séquences encadrent le microsatellite, on pourra amplifier par PCR la séquence d'ADN comprenant ce microsatellite.

Amorce gauche

----->

Amorce droite

<-----

_____TATATATATATATATATATATA_____	141pb
_____TATATATATATATATATATATA_____	139pb
_____TATATATATATATATATATATA_____	137pb
_____TATATATATATATATATATA_____	135pb
_____TATATATATATATATATA_____	133pb

Le polymorphisme étant dû à un nombre variable du motif de base répété en tandem (ici un dinucléotide), il faudra pour analyser les produits de PCR un système électrophorétique suffisamment résolutif, capable de distinguer des variations de 2 bases parmi les différents amplicons. A l'origine, on ne pouvait utiliser que des gels de polyacrylamide dénaturants. Mais maintenant, et de plus en plus, on dispose de séquenceurs automatiques permettant de réaliser une électrophorèse de l'ADN la plus résolutive qui soit, déterminant la longueur des produits amplifiés à une base près. Cela suppose d'utiliser des amorces oligonucléotidiques couplées à un fluorochrome.

Le mécanisme proposé pour expliquer le grand polymorphisme des microsatellites est, qu'au moment de la réplication, peuvent se produire des erreurs par dérapage intra-chromatidien de l'ADN polymérase conduisant à un nombre variable de répétitions en tandem des microsatellites (Kaplan et Delpech 1993). Plus le nombre de répétitions est grand, plus le risque d'erreur est élevé.

Le domaine d'application des microsatellites est immense.

Chez l'homme, Dib et coll. (1996) ont proposé une cartographie du génome humain après analyse de 5264 microsatellites polymorphes. Les microsatellites peuvent servir à établir l'origine de différentes populations humaines (Shriver et coll. 1997).

D'autres ont établi une corrélation entre microsatellites et pathologie humaine. Ainsi Kremer et coll. (1991) ont montré chez des sujets atteints du syndrome de l'X fragile qu'il existait dans le chromosome X une région dite instable. Cette région, au niveau de l'ADN, est constituée d'un trinuéotide (CCG) n répété en tandem de façon beaucoup plus importante chez les sujets atteints par rapport aux sujets sains, à l'origine de la fragilité de cette région. De même, Fu et coll. (1992) ont identifié au niveau du locus corrélié à la maladie de Steinert (ou dystrophie myotonique) un microsatellite dont le motif de base (GCT) n est beaucoup plus répété chez les sujets atteints de cette maladie. D'autres maladies neurologiques, plus rares, sont associées à une expansion du nombre de répétitions de trinuéotides (CAG) n , dits instables, au sein de microsatellites comme la maladie de Huntington (Rubinstein et coll. 1994), l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 (Orr et coll. 1993), l'atrophie héréditaire des noyaux pallido-dentato-rubriques (Koide et coll. 1994) ou encore la maladie de Machado-Joseph (Kawaguchi et coll. 1994).

En dehors de l'Homme, les microsatellites sont de plus en plus étudiés essentiellement chez les eucaryotes. Dans le domaine de la Parasitologie, ils sont utilisés entre autres pour typer les isolats d'*Aspergillus fumigatus* (Bart-Delabesse et coll. 1998), de *Trypanosoma cruzi* (Oliveira et coll. 1998), de diverses espèces de *Leishmania* (Rossi et coll. 1994), de *Plasmodium falciparum* (Su et coll. 1998) ou bien les vecteurs du paludisme (Wang et coll. 1999) et plus récemment les souches de *Cryptosporidium parvum* (Caccio et coll. 2000).

Le typage des isolats de *T. gondii* par la technique des microsatellites ne repose que sur l'étude de Costa et coll. (1997) réalisée sur un échantillonnage important (71 isolats), mais qui n'utilise qu'un seul marqueur génétique (*TUB 2*) et dont le polymorphisme allélique est limité à deux allèles.

Nous avons donc utilisé la technique des microsatellites pour typer des isolats de *T. gondii*, mais en faisant appel à plusieurs loci pour le typage et en ayant pour but de mettre en évidence un plus grand polymorphisme.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE

EXPERIMENTALE

I- Objectifs de l'étude

Une technique de typage des isolats de *T. gondii*, devrait répondre à plusieurs critères :

- critères techniques : la technique devrait être simple à mettre en oeuvre, réalisable sur n'importe quel prélèvement, facilement interprétable (entre autre, doit pouvoir identifier sans ambiguïté deux allèles différents), reproductible, sensible et spécifique.
- critères génétiques : elle doit être appliquée sur plusieurs loci ou marqueurs génétiques, indépendants (au moins six). Le nombre d'isolats typés doit être suffisamment important pour pouvoir tirer des conclusions en terme de génétique des populations. Le polymorphisme qu'elle détecte doit être « malléable ». Il semble intéressant qu'avec la même technique, on puisse avoir à la fois certains marqueurs peu polymorphes et d'autres plus polymorphes.

Un faible polymorphisme permettrait de classer les isolats parmi les 3 lignées clonales existantes et de retrouver la corrélation entre lignée clonale et répartition géographique, toxoplasmoses humaines et animales.

Si la même technique peut être appliquée à des marqueurs beaucoup plus polymorphes, on peut envisager de typer individuellement les isolats ou Finger-printing, ou de mettre en évidence une diversité génétique au sein d'un même souche comme la souche RH. Cela permettrait d'avoir un outil très utile dans un contexte d'épidémie, où l'on voudrait avoir la preuve que l'isolat obtenu en pathologie humaine est le même que celui isolé dans l'environnement. On pourrait également l'utiliser pour mettre en évidence les contaminations des prélèvements par la souche RH entretenue dans le laboratoire d'isolement. Ce pouvoir discriminant élevé de la méthode doit pouvoir distinguer deux isolats différents dans le même prélèvement, c'est à dire pouvoir détecter les infections mixtes chez l'animal, voire chez l'homme, mais aussi servir d'outil très utile dans toute expérimentation utilisant deux isolats différents de toxoplasme. Enfin, il existe peut être un marqueur génétique corrélé à la virulence pour la souris, ou de façon beaucoup plus intéressante, à l'expression d'une forme clinique particulière chez l'homme, que la technique doit pouvoir déceler. Notre technique de typage par PCR à partir de huit microsatellites différents a pour ambition de répondre à ces critères.

II- Matériel et méthodes

1- Stocks et isolats de *Toxoplasma gondii*

Nous avons typé **93 stocks** de *Toxoplasma gondii*

- 59 stocks proviennent de toxoplasmoses **humaines** dont :
 - 38 cas de toxoplasmoses **congénitales** (liste des stocks correspondants dans l'annexe 1).
 - 19 cas de toxoplasmoses **acquises** (liste des stocks dans l'annexe 2)
dont :
 - 12 cas chez des sujets immunodéprimés (dont 7 sidéens).
 - 7 cas chez des sujets immunocompétents (dont la souche RH).
 - 2 cas pour lesquels nous ne disposons pas de renseignements cliniques : Tg96 et Martin (annexe 3 bis).
- 23 stocks provenant de toxoplasmoses **animales** dont l'inventaire figure dans l'annexe 3.
- 8 stocks de la souche **RH** entretenus dans différents laboratoires, et dont la liste ainsi que l'origine figurent dans l'annexe 2.
- 2 stocks pour lesquels se posait le problème d'une éventuelle contamination au laboratoire par la souche RH : PER et GAY.
- 2 stocks sans le moindre renseignement : PMR et Wiktor (annexe 3 bis).

En terme d'**isolats**, si l'on soustrait les stocks de la souche RH, ainsi que PER et GAY, le chiffre est de **84**. Ces 84 isolats ont tous été typés préalablement par analyse isoenzymatique (sauf MEZ) par Dardé ML dans le laboratoire de Parasitologie et Mycologie du CHU Dupuytren à Limoges, et par PCR-RFLP pour 33 d'entre elles (Howe et Sibley 1996; Howe et coll. 1997). Les zymodèmes de nos 84 isolats sont reportés dans les annexes 1, 2, 3 et 3bis.

2- Extraction de l'ADN

Les différents stocks de toxoplasmes dont nous avons extrait l'ADN étaient cryoconservés dans l'azote liquide (avec du milieu essentiel minimum de Eagle ou MEM, serum de veau foetal 10% et du diméthylsulfoxyde 10%) sous forme de :

- bradyzoïtes contenus dans des kystes présents dans des cerveaux de souris infectées.

-tachyzoïtes cultivés en cultures cellulaires (CRFK, F2002, MDBK, L929 ou P388-D1) ou dans du liquide d'ascite de souris infectées.

Certains stocks étaient conservés à - 80°C sous forme d'aliquotes de 500 000 tachyzoïtes par µl (15 µl par aliquote). Ces tachyzoïtes ont été cultivés selon la méthode décrite par Dardé et coll. (1988a) avec des cellules de sarcome de souris (TG180) dans les cavités péritonéales de souris, puis purifiés de toute cellule hôte. Ces aliquotes ont servi à l'analyse isoenzymatique de ces isolats dans le laboratoire de Parasitologie et Mycologie du CHU Dupuytren à Limoges. Certains isolats ont été clonés grâce à l'isolement de kystes tissulaires par micromanipulation (Dardé et coll. 1988b).

Quelle que soit l'origine du toxoplasme, l'extraction de l'ADN a été réalisée grâce au QIA amp DNA Mini Kit® (QIAGEN Courtaboeuf, France) selon la procédure du fabricant. Les ADN une fois extraits furent stockés à +4°C en attendant d'être amplifiés par PCR.

3- Choix des microsatellites

La recherche des microsatellites dans le génome du toxoplasme a été effectuée grâce au BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en bénéficiant du programme d'étude du génome du toxoplasme. Actuellement, dans GenBank®, on dispose de près de 13 000 séquences de gènes et EST de *T. gondii* (12 551 au 7 mai 2000).

Ces séquences sont identifiables par leurs numéros d'accèsion GenBank® et sont répertoriées dans le serveur de la National Library of Medicine ou NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?db=n&form=4&dispmax=100&field=orgn&term=Toxoplasma>).

Nous avons recherché avec le BLASTN 1.4.7 dans le Toxoplasma Genome Web (<http://www.ebi.ac.uk/parasites/toxo/toxpage.html> = Blast TOXO) les séquences de *T.gondii* qui contenaient des microsatellites (TG)_n, (CT)_n, (TA)_n, (GC)_n, (AAC)_n, (AAG)_n, (AAT)_n, (ACC)_n, (ACG)_n, (ACT)_n, (AGG)_n, (AGC)_n, (AGT)_n, (ATT)_n, (GCG)_n avec un nombre de répétitions en tandem supérieur ou égal à **trois**.

Parmi le grand nombre de microsatellites retrouvés (plus de 200 séquences), 8 microsatellites à 2 nucléotides ont été sélectionnés sur la base d'un nombre suffisant de répétitions en tandem (**au moins 7**) et sur la possibilité de disposer d'amorces permettant de réaliser une PCR : deux (TG)_n, un (CT)_n et cinq (TA)_n. Parmi ces 8 microsatellites, 2 sont retrouvés dans des introns de gènes dont la fonction est connue : celui codant pour la myosine A et celui codant pour la bêta-tubuline. Les 6 autres proviennent d'EST (Expressed Sequenced Tags).

Les numéros d'accèsion GenBank® des gènes et EST utilisés, avec leurs définitions ainsi que les motifs de base des microsatellites figurent dans le tableau 4. Les séquences des deux gènes sont dans les annexes 4 et 5, celles des EST dans les annexes 6 et 6bis. Dans ces annexes, la partie en gras correspond aux microsatellites et le nombre de répétitions en tandem du motif de base est caractéristique de la souche étudiée.

N° d'accèsion GenBank®	Définition	Motif de base
M20025	Gène de la bêta-tubuline du tachyzoïte de la souche RH	(TG) _n
Y17507	Gène de la Myosine A du tachyzoïte de la souche RH	(TG) _n
<i>N60608</i>	TgESTzy20b09.r1 TgRH d'ADNc de tachyzoïte	(TA) _n
<i>AA519150</i>	TgESTzz34e04.r1 TgME49 d'ADNc de bradyzoïte	(TA) _n
<i>W35487</i>	TgESTzy77d12.r1 TgRH d'ADNc de tachyzoïte.	(CT) _n
<i>N61191</i>	TgESTzy27f04.r1 TgRH d'ADNc de tachyzoïte.	(TA) _n
<i>N82375</i>	TgESTzy52d03.r1 TgRH d'ADNc de tachyzoïte.	(TA) _n
<i>N83021</i>	TgESTzy58c09.r1 TgRH d'ADNc de tachyzoïte.	(TA) _n

Tableau 4 : Numéro d'accèsion GenBank®, définition et motif de base des microsatellites des EST et gènes sélectionnés

4- Choix des amorces

Mis à part *TUB2* pour lequel nous avons utilisé les amorces décrites par Costa et coll. (1997), nous avons recherché des amorces à partir des séquences présentées dans les annexes 4, 6 et 6bis (parties soulignées dans les annexes) dans le but d'encadrer la région comprenant les microsatellites pour l'amplifier par PCR. Cette région, amorces comprises, ne devait pas dépasser 200 nucléotides.

Le logiciel Geneworks[®] nous a permis de valider théoriquement le choix de nos couples d'amorces en nous indiquant pour chaque amorce le pourcentage de bases G et C, le T_m et s'ils passaient individuellement le test d'autocomplémentarité, mais également, un test de dimérisation et un test de complémentarité entre les deux amorces. Enfin, le logiciel nous indiquait le T_m de la région amplifiée qui devait obligatoirement être supérieur ou égal à 70 °C pour qu'il y ait amplification.

Dans chaque couple d'amorce, une des deux amorces a été couplée en 5' à un fluorochrome pour permettre de mesurer la taille du produit de PCR avec le séquenceur automatique. Les amorces 1537 Y 17507*, 36 N60608*, 58 W35487*, 139 N61191*, 5 N82375* et 120 N83021* ont été couplées avec le 6-FAM (fluorochrome bleu). Les amorces 698 M20025* et 137 AA519150* ont été couplées avec l'HEX (fluorochrome vert).

Les amorces ont été synthétisées par GibcoBRL Life technologies (Cergy Pontoise, France) ou Perkin Elmer (Courtaboeuf, France).

Les séquences de ces amorces ainsi que leurs caractéristiques figurent dans l'annexe 7.

5- Conditions de PCR

Dans nos 8 PCR, les conditions sont globalement les mêmes mis à part les températures d'hybridation et les volumes des différentes amorces à ajouter (dus aux concentrations différentes des solutions mères).

Pour un volume final de 20 μ l, voici quelles sont les conditions optimales que nous avons trouvées :

- 10 mM de Tris HCl (pH 8,3 à température ambiante)
- 50 mM de KCl
- 1,5 mM de MgCl₂
- 0,6 Unités de Taq Polymérase (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).
- 0,2 mM de dATP, dCTP et de dGTP (Roche Diagnostics, Meylan, France).
- 0,4 mM de dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France).
- 4 pmol de chaque amorce.
- 5% de diméthylsulfoxyde ou DMSO (Prolabo, Nogent sur Marne, France).
- 0,2 Unités d'Uracil DNA Glycosylase ou UDG (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Les références de chaque réactif figurent dans l'annexe 8, les conditions de PCR dans les annexes 9.

Il a été décidé de ne pas quantifier l'ADN utilisé pour les PCR : en effet la plupart de cet ADN provient de bradyzoïtes contenus dans des kystes dans des cerveaux de souris ou de tachyzoïtes issus de cultures cellulaires. Si l'on mesurait la quantité d'ADN extrait par spectrophotométrie à 260 et 280 nm, on ne mesurerait donc pas que de l'ADN extrait de toxoplasmes. Le volume optimal d'ADN à rajouter aux 17,6 μ l de mix a été évalué à 2,4 μ l soit 12% du volume final.

Le tampon 10X de la Taq polymérase Amersham fournit le Tris HCl, le KCl et le MgCl₂. Les dATP, dCTP, dGTP et dUTP sont contenus dans un mélange appelé dNTP. Le volume d'eau à utiliser est la quantité suffisante pour 20 μ l.

Les tubes utilisés pour la PCR furent soit des thermotubes 0,5 ml avec bouchon plat ABgene® (Epsom, Royaume uni), soit des microtubes 0,2 ml avec bouchon bombé (PolyLabo, Strasbourg, France).

Différents thermocyclers furent utilisés en fonction des disponibilités, mais toujours avec le même programme :

- le DNA thermalcycler 480 Perkin Elmer (Courtaboeuf, France), qui fonctionne avec des tubes de 0,5 ml et nécessite de l'huile car il n'a pas de couvercle chauffant (2 gouttes d'huile minérale (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) au dessus des 20 µl de mélange réactionnel).
- le Genecycler thermalcycler (Biorad, Ivry sur seine, France) avec des tubes 0,2 ml. Ce thermocycler ne nécessite pas d'huile.

Chaque microsatellite a été amplifié séparément. Dans chaque série, un contrôle négatif (2,4 µl d'eau à la place de l'ADN) a été ajouté pour mettre en évidence les contaminations de PCR. Une fois amplifié, l'ADN doit être mis le plus rapidement possible à -20°C. On peut le conserver à cette température en attendant de réaliser l'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose.

6- Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR

Dans le double but de vérifier que l'amplification de notre ADN a bien eu lieu et d'estimer l'intensité de cette amplification, nous avons fait migrer nos produits d'amplification sur gel d'agarose de haute résolution, qualité biologie moléculaire RESOPHOR (Eurobio, Les Ullis, France).

L'électrophorèse a été effectuée en gel d'agarose 2% en tampon Tris-Borate-EDTA ou TBE (Tris-base 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 1,25 mM ; pH 8,6) 1X (solution mère TBE 10X Biorad, Ivry sur Seine), après avoir incorporé dans le gel 2 µl de bromure d'éthidium ou BET à 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) qui est un agent intercalant et fluorescent, ce qui permet de visualiser l'ADN dans le gel sous un éclairage d'ultraviolets.

Le gel a ensuite été coulé dans une cuve d'électrophorèse MINICELL® EC370M (Electrophoretic Gel System, St Petersburg, Floride, USA) avec un maximum de 12 puits par gel :

- 11 puits sont réservés aux échantillons (dont un contient un témoin négatif) : 7,5 µl d'ADN amplifié + 3 µl de bleu de bromophénol dilué (bromophénol 0,25%, xylène-cyanol 0,25%, glycérol 30% et 100 µl de TBE 1X).
- 1 puit est réservé au marqueur de poids moléculaire : 1,5 µl de marqueur de poids moléculaire V (Roche Diagnostics, Meylan, France) + 6 µl de TBE 1X + 3 µl de bleu de bromophénol dilué.

Nous avons fait migrer l'ADN amplifié 25 minutes à 120 volts à l'aide d'un générateur de champ électrique modèle PS 250/2,5 AMP (Hoefer Scientific instruments, San Francisco, Californie, USA). Puis nous avons photographié le gel avec un film Seikosha VP-15052S 110mm / 21m (Seiko precision Inc, Japon) sous éclairage par ultraviolets avec l'appareil FluoLink (Céra.Labo, Aubervilliers, France). La présence d'ADN est visualisée par une bande fluorescente d'intensité variable sur le gel, dont la taille peut être estimée par comparaison à la migration de marqueur de poids moléculaire (distance de migration des fragments d'ADN inversement proportionnelle au Log10 de leur taille).

Nous donnons un exemple, avec la photo 1, d'une électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN amplifié contenant le microsatellite de l'EST *N83021* de 7 stocks de *T. gondii*.

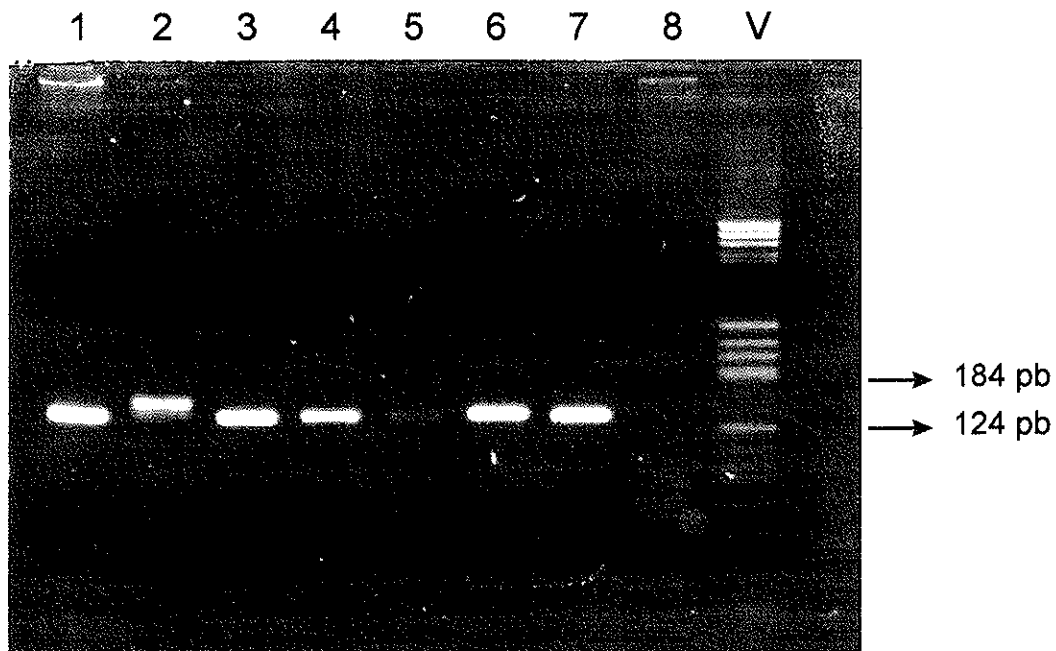


Photo 1 : électrophorèse sur gel d'agarose 2% de l'ADN de 8 stocks après amplification du microsatellite de l'EST N83021

Puits N°1 : stock RH 88

Puits N°2 : stock ccRH

Puits N°3 : stock RH Lyon

Puits N°4 : stock RH THU

Puits N°5 : stock TS4

Puits N°6 : stock P80

Puits N°7 : stock DEGR

Puits N°8 : Témoin négatif

V : Marqueur de poids moléculaire

7- Electrophorèse de l'ADN amplifié sur séquenceur automatique

Elle a été réalisée sur séquenceur automatique Abiprism[®] 310 collection 1.0 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

7-1 Principe

L'électrophorèse de l'ADN amplifié dénaturé couplé à un fluorochrome bleu (6-FAM) ou vert (HEX) s'effectue sur gel de polyacrylamide POP4 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) dans un capillaire 47 cm / 50 µm pour analyse génétique POP4 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Conjointement, migre un marqueur de poids moléculaire le Genescan[®] 350 red dye labelled ou Rox 350 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Ce marqueur contient des fragments d'ADN dénaturés de 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300 et 350 bases. Ces fragments sont couplés à un fluorochrome rouge (ROX).

La détection des fragments d'ADN amplifiés et du marqueur se fait par mesure de fluorescence en continu. Chaque fois qu'un fragment d'ADN, lors de sa migration, passe devant le détecteur de fluorescence, l'appareil enregistre et quantifie un signal de fluorescence dans le bleu ou le vert (ADN amplifié) ou dans le rouge (marqueur de poids moléculaire) à un temps T de la migration.

Puis c'est le logiciel GeneScan[®] Software Analysis 2.1 qui analyse toutes les données enregistrées lors de la migration et nous donne une taille de l'ADN amplifié à une base près en comparant le temps T de la détection de l'ADN amplifié aux temps de détection des divers fragments de taille connue du marqueur.

Par exemple, si le fragment de 100 bases du marqueur est détecté 17,20 minutes après le début de la migration, celui de 139 à 18,86 minutes et celui de 150 à 19,28 minutes et si notre ADN amplifié, grâce à son fluorochrome couplé, est détecté 18,77 minutes après le début de la migration, le logiciel en déduira que notre ADN amplifié a une taille de 136,57 bases soit 137 bases.

Le logiciel nous indique tous les signaux de fluorescence détectés, leur intensité de fluorescence ainsi que le temps T de leur détection après le début de la migration. Ces données sont également disponibles dans un graphique avec des pics correspondant à la détection de l'ADN amplifié (bleu ou rouge) et des fragments du marqueur (rouge).

7-2 Utilisation

Avant de faire migrer notre ADN amplifié fluorescent sur le séquenceur automatique, nous réalisons des manipulations dont voici la procédure pour un échantillon :

Dans un tube à échantillon de 0,5 ml (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France), il faut ajouter 24 µl de formamide (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) et 0,5 µl du marqueur de poids moléculaire ROX 350.

Le volume d'ADN amplifié à ajouter varie en fonction de l'intensité de la bande obtenue sur gel d'agarose. Ceci se fait à l'oeil et nécessite une certaine pratique acquise avec le temps. Ne sont traités que les ADN pour lesquels une bande visible à l'oeil nu est observée sur la photographie du gel :

- Pour des bandes très intenses, nous diluons l'ADN au 1/10 voire au 1/15 dans du formamide (1 µl d'ADN + 9 ou 14 µl de formamide). 1 µl de cette dilution est à rajouter au mélange formamide + ROX 350.
- Pour des bandes moyennement intenses, la dilution n'est plus que de 1/5 ou 1/2 (on rajoute également 1µl de cette dilution).
- On peut aussi rajouter de l'ADN amplifié pur si les bandes sont peu intenses : 1 ou 2 µl. Quand les bandes sont à la limite de la visibilité on peut aller jusqu'à 3 µl.

Cette étape acquise avec l'expérience est fondamentale : une quantité d'ADN trop importante donnera un signal de fluorescence trop intense difficilement interprétable. Inversement, une quantité d'ADN trop faible risque de se traduire par une absence de signal de fluorescence. Le mélange Formamide + ROX350 + ADN dilué ou non, préalablement bouché avec les septa pour tube à échantillon de 0,5 ml (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) devra ensuite subir une **dénaturation** par chauffage à 94°C pendant 4 minutes dans le thermocycler PE 480.

Après la dénaturation, les tubes doivent être mis immédiatement dans de la glace. Nos échantillons sont alors prêts pour l'électrophorèse sur le séquenceur automatique.

8- Analyse statistique des données

Une analyse statistique de l'ensemble des données a été réalisée par analyse factorielle des correspondances grâce au logiciel Genetix®.

9- Mise en évidence expérimentale d'infections mixtes chez la souris

Nous avons réalisé des infections par ingestion de kystes de 2 souches différentes chez des souris Swiss pesant entre 20 et 30 g et âgées de 4 semaines, soit simultanément, soit à 1 h, 24 h, 72 h et 7 jours d'intervalle.

Deux souris infectées respectivement par le stock DEG et le stock NED ont été sacrifiées pour récupérer leur cerveau. Les deux cerveaux ont été broyés séparément dans 1 ml d'eau physiologique et examinés au microscope au grossissement 40 afin de compter les kystes. Des dilutions en eau physiologique de ces cerveaux ont été effectuées afin de disposer de suspensions à 10 kystes / 100 µl de chacun des deux stocks. Ces suspensions ont été conservés pendant les 7 jours à +4°C.

A J0, nous avons fait ingérer, per os avec une sonde de gavage, à une souris un mélange à part égale de NED et de DEG (100 µl de chaque suspension) afin de réaliser une infection mixte concomitante.

Toujours à J0, nous avons fait ingérer per os à 4 souris 100 µl de la suspension NED et à 4 autres souris 100 µl de la suspension DEG. Chacune de ces souris infectée à J0 par un stock va être infectée par l'autre stock (avec 100 µl de la suspension correspondante per os) 1 heure, 1, 3 et 7 jours plus tard.

Un mois après ces coinfections réalisées soit simultanément, soit à 1 heure, 1, 3 et 7 jours d'intervalle, nous avons sacrifié les souris, extrait l'ADN du cerveau pour l'amplifier par PCR avec le microsatellite *N60608*.

III Résultats

1- Résultats de la PCR et de l'électrophorèse des produits PCR amplifiés sur séquenceur automatique

Nous avons pu amplifier par PCR les 8 microsatellites pour chacun des 93 stocks et ce, qu'ils aient pour origine des bradyzoïtes de kystes cérébraux chez des souris infectées ou des tachyzoïtes dans des cultures cellulaires, liquides d'ascite ou purifiés. Après électrophorèse de l'ADN amplifié des 8 microsatellites des 93 stocks, nous avons dans tous les cas détecté un signal de fluorescence permettant de mesurer en nombre de bases la longueur ou taille de l'ADN amplifié dénaturé. Les résultats complets du typage de nos 93 stocks avec les 8 microsatellites sont reportés dans l'annexe 10.

Pour ce qui est de notre mise en évidence expérimentale de l'infection mixte chez la souris, nous avons obtenu dans tous les cas une amplification positive à partir des cerveaux, et des pics de fluorescence (1 ou 2) après passage sur séquenceur automatique.

La **reproductibilité** de la technique a été évaluée à plusieurs niveaux. Nous avons observé la même taille du produit PCR pour un microsatellite donné d'un même stock :

- quand l'ADN amplifié était passé plusieurs fois sur le séquenceur automatique dans la même série d'électrophorèse ou dans une série différente.
- à partir de plusieurs séries de PCR d'un même ADN extrait.
- à partir d'ADN extraits à plusieurs reprises d'une source unique (soit cerveaux, soit cultures soit ascites).
- à partir d'ADN du même stock mais extrait de sources différentes (cerveaux, cultures cellulaires et ascites).
- à partir d'ADN du même stock, mais issus de stabilats différents cryoconservés à des années d'intervalle.

Dans les cas où plusieurs pics de fluorescence étaient détectés, n'a été pris en compte que le signal présentant l'intensité de fluorescence la plus élevée.

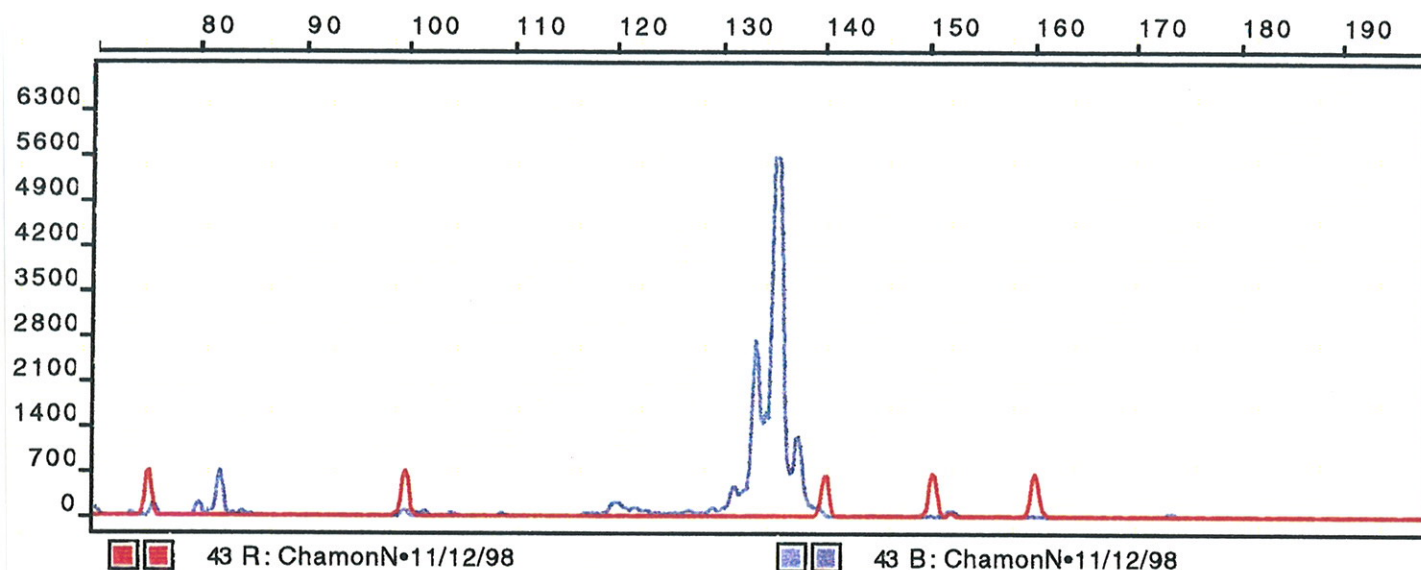
La plupart du temps, la longueur en base indiquée par le logiciel GeneScan® était un nombre à virgule. Nous avons arrondi au nombre supérieur ou inférieur selon que ce nombre était pair pour les microsatellites de la bêta-tubuline, *N61191* et *AA519150* et impair pour les autres microsatellites.

Pour un stock donné, la longueur en bases obtenue pour un microsatellite est un allèle de ce microsatellite. Nous donnons un exemple d'analyse par le logiciel GeneScan® dans la figure 2 pour le stock CHAMON, où 3 pics de fluorescence bleus ont été observés avec le microsatellite *N60608*.

Les caractéristiques de ces trois pics sont reportés dans le tableau 5. On voit que le pic dont l'intensité de fluorescence est la plus élevée a été détecté à 17,60 minutes. Ce pic se détache nettement des deux autres pics parasites comme on peut le voir dans la figure 2. C'est donc ce pic qui nous donne la longueur en bases du produit PCR obtenu après amplification de l'ADN contenant le microsatellite de l'EST *N60608* du stock CHAMON. Il suffit ensuite d'arrondir au chiffre supérieur impair pour conclure que le stock CHAMON possède l'allèle 135 dans le microsatellite *N60608*.

Temps de détection (minutes)	Taille (bases)	Fluorescence (intensité)
17,52	132,39	23602
17,55	133,35	11720
17,60	134,51	67205

Tableau 5 : données GeneScan® du stock CHAMON pour le microsatellite *N60608*



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
43R, 1	15.23	75.00	710	5571	4152
43R, 2	16.23	100.00	730	5873	4424
43R, 3	17.77	139.00	651	5382	4844
43R, 4	18.15	150.00	691	5408	4948
43R, 5	18.50	160.00	701	5773	5044
43B, 1	17.52	132.39	2751	23602	4776
43B, 2	17.55	133.35	1629	11720	4786
43B, 3	17.60	134.51	5597	67205	4798

Figure 2 : données analysées par le logiciel GeneScan® après électrophorèse sur séquenceur automatique de l'ADN amplifié par PCR contenant le microsatellite de l'EST N60608 du stock CHAMON

2- Typage génétique de la population globale

En fonction du polymorphisme allélique (tableau 6), nous avons 3 sortes de marqueurs :

- 3 microsatellites sont peu polymorphes : 2 à 4 allèles pour *TgM-A*, *TUB2* et l'EST *W35487*.
- 3 microsatellites sont moyennement polymorphes : 7 allèles pour l'EST *N60608* et 10 allèles pour les EST *N82375* et *N83021*.
- 2 microsatellites sont très polymorphes avec 16 allèles pour l'EST *AA519150* et 15 pour l'EST *N61191*.

Microsatellite	Nombre d'allèles	Tailles du produit PCR (extrêmes)
<i>TUB2</i>	3	122-126 pb
<i>W35487</i>	2	95-101 pb
<i>TgM-A</i>	4	115-121 pb
<i>N60608</i>	7	131-145 pb
<i>N82375</i>	10	107-131 pb
<i>N83021</i>	10	125-161 pb
<i>AA519150</i>	16	134-170 pb
<i>N61191</i>	15	120-160 pb

Tableau 6 : polymorphisme allélique des huit microsatellites

L'association des 8 marqueurs permet de différencier au sein des 93 stocks 77 génotypes différents démontrant le pouvoir discriminant élevé de cette technique. Mais, cette technique permet malgré tout de déterminer au sein de la population étudiée des groupes génotypiques particuliers.

Avec les 3 microsatellites les moins polymorphes (respectivement *TUB2*, *W35487* et *TgM-A*), on peut classer la majorité de nos isolats (85,7%) en 3 groupes principaux, appelés **génotypes ou groupes μ SAT**, corrélés étroitement avec ceux décrits par PCR-RFLP ou par zymodèmes (tableau 7) :

- Le groupe μ SAT I est caractérisé par l'association des allèles 126 (*TUB2*), 101 (*W35487*) et 121 (*TgM-A*) et comprend 12 isolats soit 14,3%.
- Le groupe μ SAT II est caractérisé par l'association des allèles 124 (*TUB2*), 95 (*W35487*) et 119 (*TgM-A*) et comprend 49 isolats soit 58,3%.
- Le groupe μ SAT III est caractérisé par l'association des allèles 124 (*TUB2*), 95 (*W35487*) et 117 (*TgM-A*) et comprend 11 isolats soit 13,1%.

Zymodème	Groupe μ SAT	<i>TUB2</i>	<i>W35487</i>	<i>TgM-A</i>	isolats
Z1	I	126	101	121	12
Z2 et Z4	II	124	95	119	49
Z3, Z6 et Z8	III	124	95	117	11
Z1	I/III	126	101	117	5
Z5, Z9, Z10 et Z11	III/I	126	95	117	4
Z2	II/I	124	95	121	1
Z7	IV	122	95	119	1
Z12	V	126	95	115	1

	Allèle typique du groupe μ SAT I
119	Allèle typique du groupe μ SAT II
117	Allèle typique du groupe μ SAT III
	Allèle atypique

Tableau 7 : combinaison des allèles des 3 microsatellites les moins polymorphes en groupes μ SAT et répartition dans ces groupes des 84 isolats

Ainsi seul le gène de la myosine possède 3 allèles qui sont chacun spécifiques d'un des trois groupes principaux. Les deux allèles du gène de la bêta-tubuline (126 et 124), ainsi que les deux allèles de l'EST *W35487* (101 et 95) permettent de différencier uniquement le groupe I des groupes II et III.

Il existe également des isolats pouvant correspondre à des recombinaisons entre le groupe I et le groupe III :

- d'une part, un sous-groupe **μSAT I / III** constitué de 5 isolats classés par les méthodes usuelles en type I (PCR-RFLP) ou zymodème 1 et qui présente un profil 126-101-117, c'est à dire 2 allèles typiques du groupe I et un allèle typique du groupe III. Il s'agit des isolats DPHT, FOU, DUCH, GPHT et WIKTOR.

- d'autre part, un deuxième sous-groupe **μSAT III / I** présente un profil plus proche du groupe III : il est constitué de 4 isolats dont le profil (126-95-117) comporte une majorité d'allèles du groupe III. Ce sous-groupe correspond à des isolats dont le zymodème est atypique et unique : Z5 (MAS), Z9 (P89), Z10 (P80) et Z11 (SSI119).

- Un sous-groupe **μSAT II / I** constitué d'un seul isolat de zymodème II, présente deux allèles du groupe II et un allèle typique du groupe I. Il peut donc correspondre à une recombinaison entre le groupe II et le groupe I. Il s'agit de l'isolat GANGI.

Deux autres groupes sont constitués par des isolats uniques aux profils microsatellites atypiques et dont les zymodèmes sont également atypiques :

- Un groupe **μSAT IV** constitué de l'unique isolat CAST (Z7) possède un allèle du gène de la bêta-tubuline (122) uniquement rencontré chez cet isolat.

- Un groupe **μSAT V** constitué de l'unique isolat VAND (Z12) possède un allèle du gène de la myosine (115) uniquement rencontré chez cet isolat.

Dans notre population de 84 isolats, on voit d'après la figure 3, que le groupe II est largement prépondérant (58,3%).

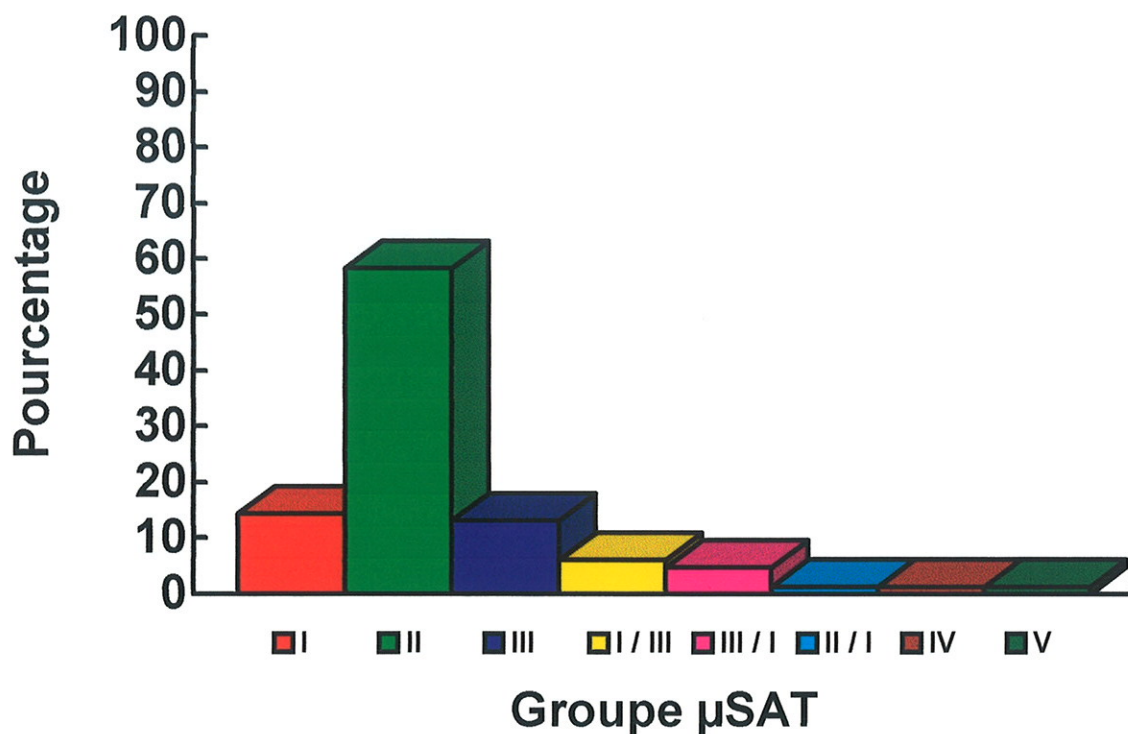


Figure 3 : fréquence des groupes μ SAT dans notre population globale de 84 isolats

Ces séparations en différents groupes sont bien visualisées par l'analyse factorielle des correspondances sur l'ensemble des huit microsatellites effectuée à l'aide du logiciel Genetix® dont une représentation graphique de l'analyse factorielle des correspondances se trouve dans la figure 4.

Les isolats de zymodème 1 sont nettement différenciés de tous les autres isolats. Au sein des isolats de zymodème 1, on distingue aisément le groupe μ SAT I du sous groupe de 5 isolats correspondant à une recombinaison entre les groupes μ SAT I et III. C'est la première fois que l'on peut mettre en évidence deux sous-groupes parmi les isolats de type I ou zymodème 1. Les isolats des zymodèmes 2 et 4 sont rassemblés au sein du groupe μ SAT II. Les isolats de zymodème 3 sont réunis dans le groupe μ SAT III situé entre les groupes μ SAT I et II.

Les isolats correspondant aux zymodèmes atypiques apparaissent satellites du groupe μ SAT III sauf RUB (Z6) apparenté au groupe μ SAT II. Les isolats VAND (Z12) et surtout CAST (Z7) se distinguent nettement des trois groupes μ SAT principaux.

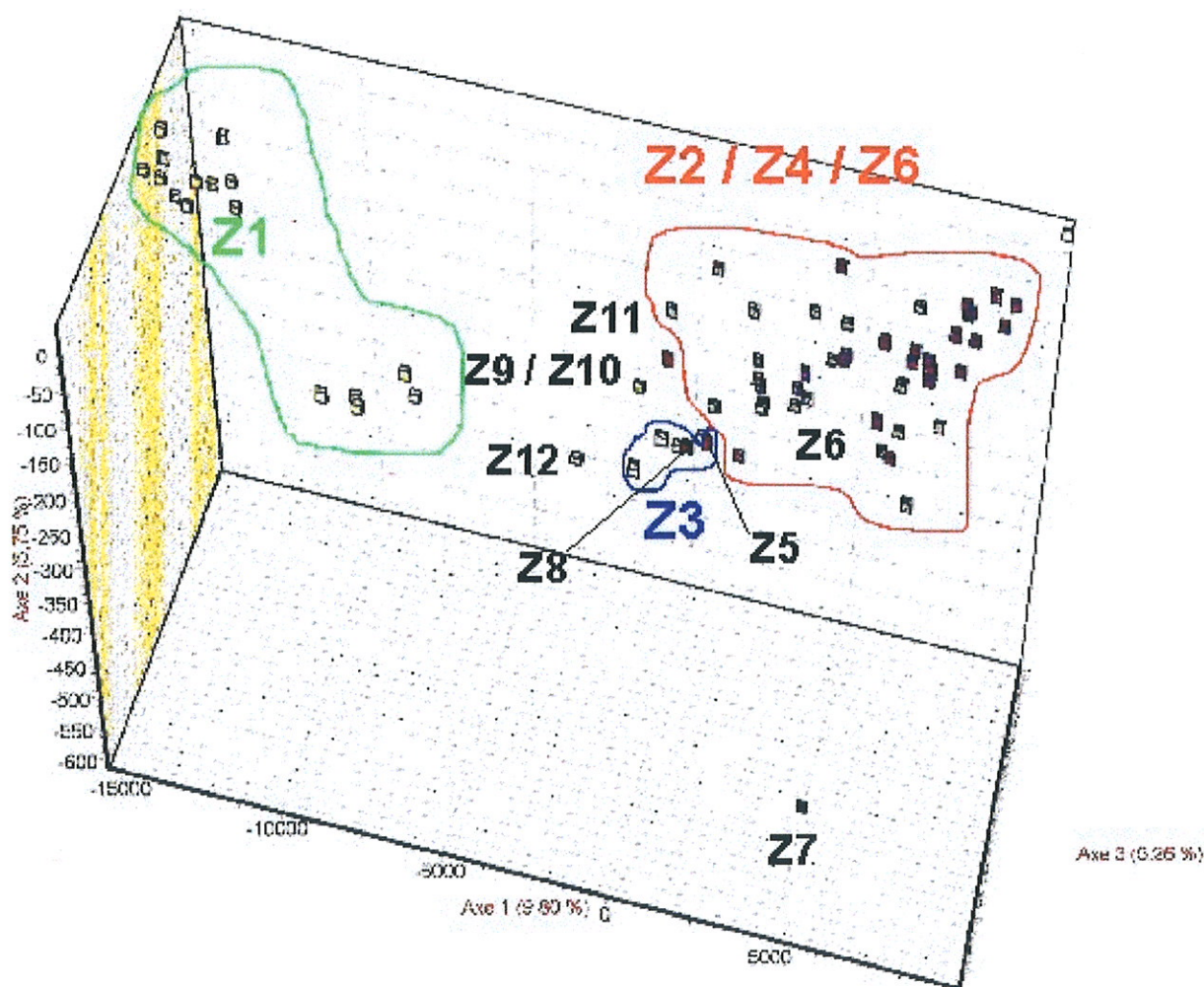


Figure 4 : représentation graphique de l'analyse factorielle des correspondances réalisée par le logiciel Genetix® à partir des données du génotypage de huit microsatellites pour 93 stocks de *Toxoplasma gondii*

3-Typage génétique et répartition géographique

3-1 Pays d'origine

Nous avons pu avoir des renseignements sur le pays d'origine d'isolement pour 80 de nos isolats (tableau 8)

Pays d'origine	Toxoplasmose humaine congénitale	Toxoplasmose humaine autre	Toxoplasmose animale	Isolats
France	36	10	8	54
Belgique	1	3		4
Hollande	1			1
Angleterre		1	2	3
Allemagne		1		1
Danemark			1	1
USA		1	1	2
Argentine			1	1
Uruguay		1	2	3
Guyane Fr.		2		2
Total	38	19	23	80

Tableau 8: répartition des isolats en fonction des pays et de leur origine

Comme on peut le voir sur la figure 5, la grande majorité de nos isolats proviennent d'Europe (80%) et notamment de France (67,5%).

Le reste de nos isolats proviennent pour une part des USA (12,5%) et pour une autre part d'Amérique du Sud (7,5%).

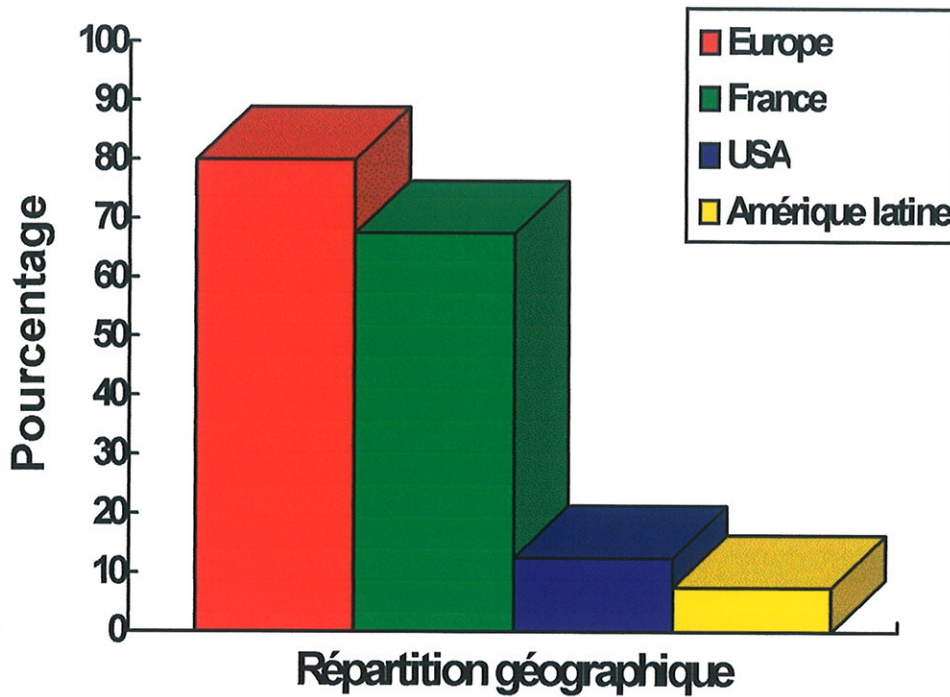


Figure 5 : répartition des isolats entre l'Europe (dont la France), les USA et l'Amérique latine

3-2 Répartition des génotypes dans les différents pays

On voit dans le tableau 9 que l'on trouve des isolats des trois groupes μ SAT principaux (I, II et III) aussi bien en Europe, qu'aux USA ou encore en Amérique du Sud.

En revanche, les génotypes atypiques (groupe IV et V) proviennent uniquement d'Amérique du Sud pour ce qui est de notre échantillonnage de deux isolats.

Pays d'origine	μ Sat I	μ Sat II	μ Sat III	μ Sat I/III	μ Sat III/I	μ Sat II/I	μ Sat IV	μ Sat V
France	6	38	6	3	1			
Belgique		2		1		1		
Hollande	1							
Angleterre		3						
Allemagne		1						
Danemark					1			
					2			
Argentine		1						
Uruguay	1		1				1	
Guyane Fr			1					1
Total	10	48	11	4	4	1	1	1

Tableau 9 : répartition des génotypes μ SAT en fonction des pays

On voit d'après la figure 6, que la répartition des groupes μ SAT en France est à peu de choses près la même que celle observée dans notre population globale de 84 isolats (figure 3).

La différence de pourcentage de type II entre les isolats provenant de France (70,4%) et les isolats de la population globale (58,3%) n'est pas significative ($p = 0,15$).

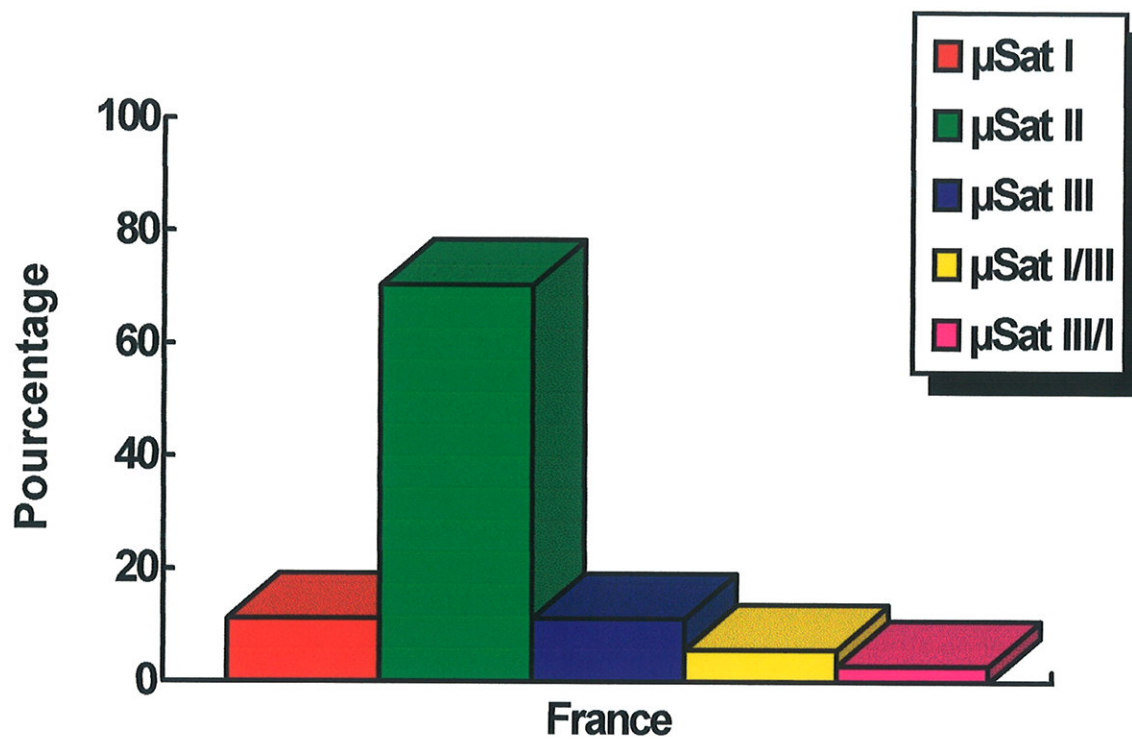


Figure 6 : répartition des génotypes μ SAT des isolats provenant de France

4- Typage génétique et toxoplasmose

Nous avons réparti les 59 isolats d'origine humaine (toxoplasmoses acquises et congénitales) et les 23 d'origine animale en fonction de leur groupe μ SAT dans le tableau 10.

	Isolats	μ Sat I	μ Sat II	μ Sat III	μ Sat III/I	μ Sat I/III	μ Sat III/I	μ Sat IV	μ Sat V
TOXOPLASMOSES HUMAINES	59 100%	10 17%	36 61%	6 10,1%	1 1,7%	4 6,8%	1 1,7%		1 1,7%
congénitales	38 100%	7 18,5%	25 65,8%	3 7,9%	1 2,6%	1 2,6%	1 2,6%		
acquises	19 100%	2 10,5%	10 52,6%	3 15,8%		3 15,8%			1 5,3%
TOXOPLASMOSES ANIMALES	23 100%	1 4,3%	13 56,6%	5 21,8%	3 13%			1 4,3%	

Tableau 10 : répartition en groupes μ SAT des isolats provenant de toxoplasmoses humaines (congénitales et acquises) et animales.

On voit dans la figure 7 que, là encore, le groupe μ SAT II est majoritaire, que les isolats soient d'origine humaine ou d'origine animale (sans différence significative entre les deux : $p = 0,7$).

La plus grande fréquence d'isolats de groupe μ SAT III dans les toxoplasmoses animales (21,8%) par rapport aux toxoplasmoses humaines (10,1%) n'est pas statistiquement significative ($p = 0,15$).

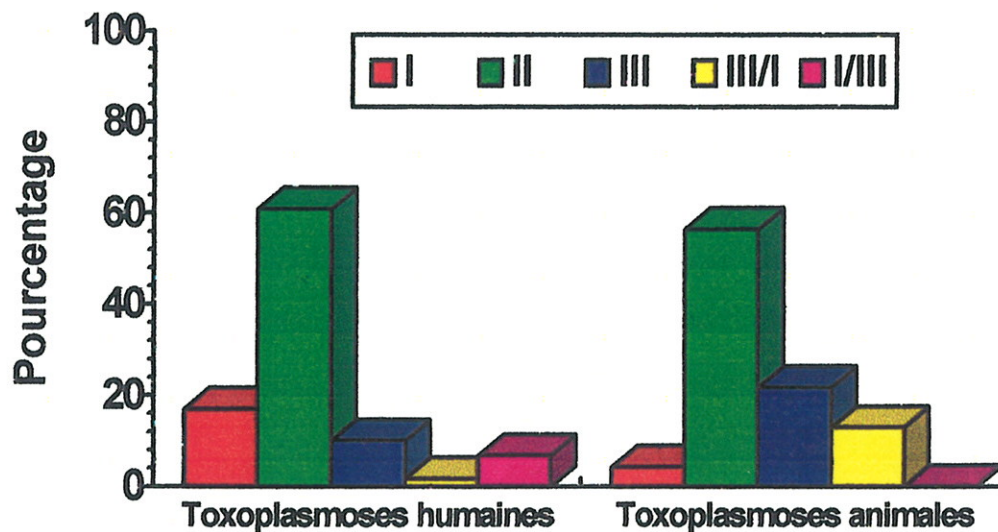


Figure 7 : fréquence des groupes μ SAT dans les isolats d'origine humaine et animales

Nous avons comparé dans la figure 8 la fréquence des trois groupes μ SAT principaux dans les toxoplasmoses humaines acquises et congénitales versus toxoplasmoses animales.

La plus grande fréquence d'isolats des groupes μ SAT I et II dans les toxoplasmoses humaines congénitales (respectivement 18,5% et 65,8%) par rapport aux toxoplasmoses humaines acquises (respectivement 10,5% et 52,6%) n'est pas statistiquement significative (respectivement $p = 0,36$ et $p = 0,33$).

De même la plus grande fréquence d'isolats de groupe III dans les toxoplasmoses animales (21,8%) par rapport aux toxoplasmoses humaines congénitales (7,9%) ou acquises (15,8%) n'est pas statistiquement significative (respectivement $p = 0,12$ et $p = 0,46$).

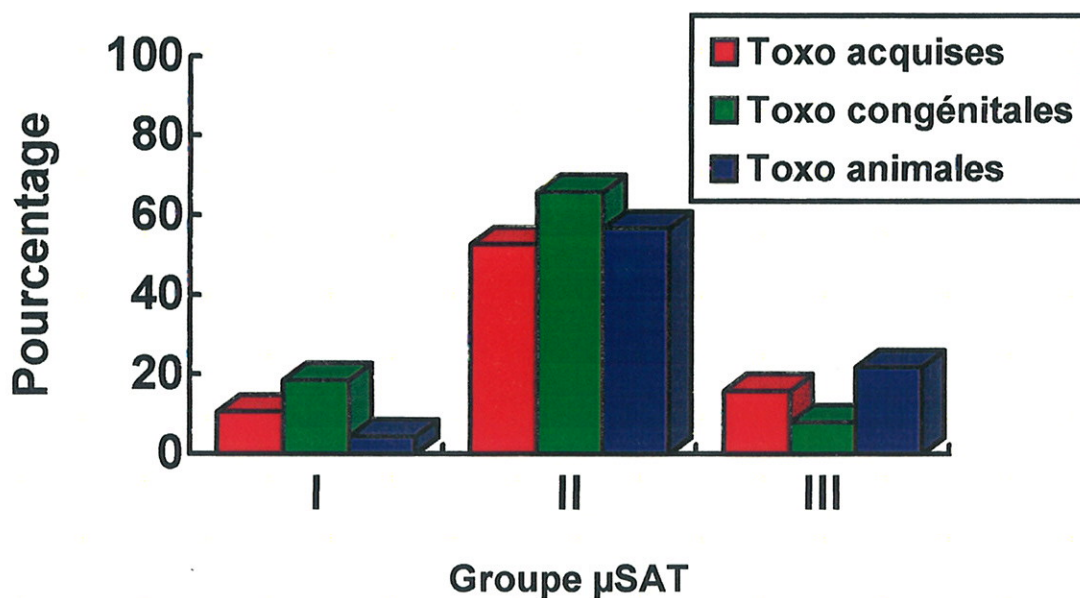


Figure 8 : fréquence des trois groupes μ SAT principaux dans les toxoplasmoses humaines acquises et congénitales versus toxoplasmoses animales.

4-1 Typage génétique et toxoplasmoses congénitales

Parmi nos 38 cas de toxoplasmoses congénitales, nous avons différencié les 36 cas pour lesquels nous avons des renseignements cliniques, en fonction du devenir de l'infection : 5 isolats correspondent à des formes mortelles, 9 à des formes ayant entraîné des interruptions médicales de grossesse ou IMG, 18 à des formes asymptomatiques ou bénignes et 4 correspondent à des cas particuliers sans infection. L'inventaire de ces isolats, la date et le pays d'isolement, les lésions organiques associées, la date présumée de l'infection maternelle, ainsi que leur appartenance à une de ces formes cliniques sont reportées dans l'annexe 1.

Nous avons essayé de corréler les différentes formes de toxoplasmoses congénitales aux génotypes définis par l'association des trois microsattellites les moins polymorphes ou groupes μ SAT (**tableau 11 et figure 9**), mais aussi aux génotypes définis par l'association des huit microsattellites (**tableau 12**).

	isolats	μ Sat I	μ Sat II	μ Sat III	μ Sat I/III	μ Sat III/I
Toxoplasmoses congénitales	36 (100%)	7 (19,5%)	24 (66,6%)	3 (8,3%)	1 (2,8%)	1 (2,8%)
asymptomatiques	18 (100%)	0	15 (83,3%)	2 (11,1%)	1 (5,6%)	0
mortelles	5 (100%)	1 (20%)	4 (80%)	0	0	0
Interruption Médicale de Grossesse (IMG)	9 (100%)	2 (22,2%)	5 (55,6%)	1 (11,1%)	0	1 (11,1%)
pas d'infection	4 (100%)	4 (100%)	0	0	0	0

Tableau 11 : répartition des groupes μ SAT en fonction des différentes formes de toxoplasmoses congénitales humaines

La plus grande fréquence d'isolats du groupe μ SAT II (Figure 9) dans la population d'isolats ayant entraîné des formes asymptomatiques (83,3%) par rapport à celle ayant entraîné des IMG (55,6%) n'est pas statistiquement significative ($p= 0,13$).

Il apparaît nettement dans la figure 9 que les quatre isolats provenant de placenta et n'ayant pas entraîné de toxoplasmose congénitale chez l'enfant appartiennent tous au groupe μ SAT I.

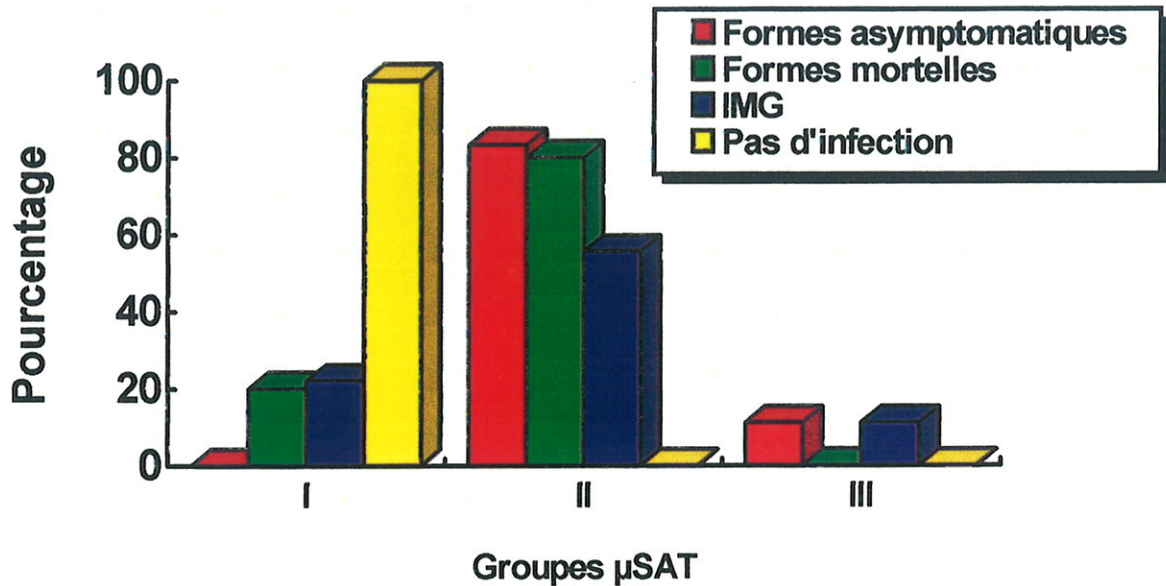


Figure 9 : fréquence des principaux groupes μ SAT dans les différentes formes de toxoplasmoses congénitales humaines.

Si on analyse dans le tableau 12, les génotypes obtenus avec les 8 microsatellites pour chaque isolat responsable de toxoplasmose congénitale, on s'aperçoit qu'il n'y a pas d'allèle spécifique de la toxoplasmose congénitale. De même, dans chaque forme clinique (asymptomatique, mortelle ou ayant entraîné une IMG), on constate que pour chaque microsatellite, la majorité des allèles sont représentés : il n'y a pas là non plus, d'allèles ou de génotypes spécifiques d'une des formes cliniques de toxoplasmose congénitale. En revanche, dans les 4 cas sans infection de groupe μ SAT I, on remarque une très grande homogénéité génotypique. Ils ont des allèles identiques dans 6 microsatellites sur 8. Les différences ne se situent qu'au niveau des microsatellites *N82375* et *N83021* où le polymorphisme ne dépasse pas 2 allèles. Deux de ces quatre isolats ont des génotypes strictement identiques : PIL et FAJI.

STOCK	TUB2	W35487	TgM-A	N60608	N82375	N83021	N61191	AA519150	μSAT
PSP19	124	95	119	135	109	133	122	146	II
GANGI	124	95	121	133	109	133	138	138	III/I
LGE96-1	124	95	119	135	109	133	122	150	II
CHAM	124	95	119	137	115	131	150	142	II
PRU	124	95	119	137	115	131	160	142	II
C	124	95	119	145	109	133	124	140	II
BK	126	101	121	139	117	137	122	142	I
TONT	124	95	117	137	109	133	122	158	III
MAS	126	95	117	137	109	161	130	134	III/I
AUD	124	95	119	133	121	131	144	146	II
PSP2	124	95	119	137	109	135	132	140	II
CHAT	124	95	119	137	113	131	134	138	II
FOLIA	124	95	119	137	113	131	134	136	II
FAR	124	95	119	139	109	135	142	146	II
GIL	126	101	121	141	117	127	122	142	I
MOR	126	101	121	141	117	127	122	142	I
LGE97-3	124	95	117	141	109	133	122	140	III
NED	124	95	117	141	109	133	126	144	III
CRO	124	95	119	131	121	133	124	136	II
DEG	124	95	119	133	111	131	134	142	II
SZY	124	95	119	135	107	131	128	146	II
GRE98-1	124	95	119	135	107	133	140	154	II
CHAMON	124	95	119	135	109	131	126	136	II
CAL	124	95	119	135	109	135	122	152	II
REN	124	95	119	135	113	131	124	140	II
PSP12	124	95	119	135	117	133	122	142	II
MEZ	124	95	119	137	109	133	132	144	II
LGE95-1	124	95	119	137	109	135	138	142	II
PRE	124	95	119	137	111	131	138	138	II
PON	124	95	119	137	113	131	136	146	II
LGE94-2	124	95	119	139	109	131	122	136	II
DAS	124	95	119	139	117	131	128	138	II
ROD	124	95	119	135	111	131	134	136	II
GPHT	126	101	117	141	109	127	126	152	III/II
ENT	126	101	121	139	117	127	122	144	I
PIL	126	101	121	139	117	129	122	144	I
FAJI	126	101	121	139	117	129	122	144	I
P	126	101	121	139	119	129	122	144	I

	Sans renseignements cliniques
	Formes mortelles
	Formes ayant entraîné une IMG
	Formes asymptomatiques ou bénignes
	Pas d'infection

Tableau 12 : répartition des génotypes issus de la combinaison des 8 microsatellites dans les isolats des différentes formes de toxoplasmose congénitale humaine.

4-2 Typage génétique et toxoplasmoses acquises

Parmi nos 19 cas de toxoplasmosse acquise humaine, nous connaissons le statut immunitaire du patient dans 18 cas. Nous avons écarté la souche RH pour laquelle, nous n'avons pas de renseignements sur le statut immunitaire de l'enfant chez qui a été isolée cette souche.

Six isolats ont été obtenus chez des sujets à priori immunocompétents et 12 chez des immunodéprimés. Parmi les causes d'immunodépression, le SIDA est responsable dans 7 cas. L'inventaire de ces isolats, leur répartition selon le critère du statut immun, leur clinique prépondérante et la date et le lieu de leur isolement sont dans l'annexe 2.

Nous avons essayé de corréliser les différentes formes de toxoplasmoses acquises aux génotypes définis par l'association des trois microsattellites les moins polymorphes ou groupes μ SAT (**tableau 13 et figure 10**), mais aussi aux génotypes définis par l'association des huit microsattellites (**tableau 14**).

On voit dans le tableau 13 que le groupe μ SAT II est prépondérant quelle que soit la forme de toxoplasmosse acquise (à part dans le groupe des immunodéprimés autres que SIDA, mais l'échantillonnage est trop faible pour pouvoir tirer la moindre conclusion).

	Isolats	μ Sat I	μ Sat II	μ Sat III	μ Sat I/III	μ Sat III/I	μ Sat V
IMMUNOCOMPETENTS	6 100%		3 50%	1 16,7%	1 16,7%		1 16,7%
IMMUNODEPRIMES	12 100%	1 8,3%	7 58,3%	2 16,7%	2 16,7%		
SIDA	7 100%	1 14,3%	5 71,4%	1 14,3%			
AUTRES	5 100%		2 40%	1 20%	2 40%		

Tableau 13 : répartition des isolats en groupes μ SAT dans les différentes formes de toxoplasmoses acquises

La plus grande fréquence du groupe μ SAT II (figure 10) dans la population d'isolats provenant de patients atteints du SIDA (71,4%) par rapport aux immunocompétents (50%), à l'ensemble des patients ayant une toxoplasmose acquise (52,6%), à l'ensemble des toxoplasmoses humaines (61%) ou animales (56,6%) n'est pas statistiquement significative ($p = 0,41$; $p = 0,34$; $p = 0,46$; $p = 0,40$).

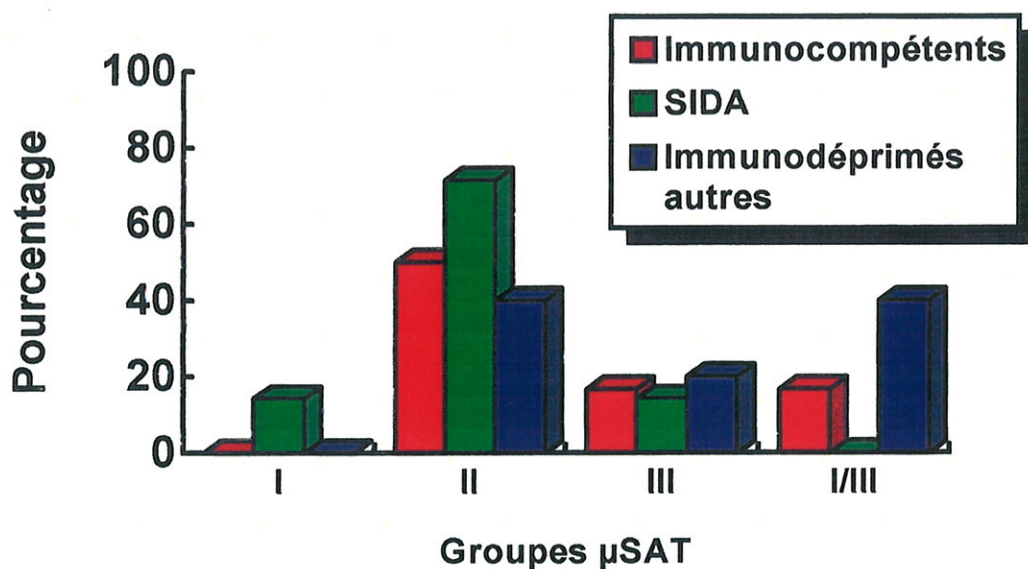


Figure 10 : fréquence des principaux groupes μ SAT dans les différentes formes de toxoplasmose acquise.

On voit d'après le tableau 14 qu'il n'y a pas d'allèle spécifique d'une des formes de toxoplasmose acquise en fonction du statut immunitaire dans aucun des huit microsattellites.

STOCK	TUB2	W35487	TgM-A	N60608	N82375	N83021	N61191	AA519150	μSAT
RUB	124	95	117	137	107	133	120	136	III
MILIS	124	95	119	135	107	133	132	136	II
JONES	124	95	119	137	109	131	132	142	II
DEGR	124	95	119	141	109	131	122	134	II
VAND	126	95	115	137	109	129	126	154	V
DUCH	126	101	117	141	109	129	126	146	I/III
LEG-NJA	124	95	117	141	109	133	126	144	III
SUR	124	95	119	135	107	135	124	156	II
NTE	124	95	119	135	111	131	138	146	II
MAN-NJA	124	95	119	137	119	133	134	142	II
ELG	124	95	119	137	131	131	142	144	II
BOU	124	95	119	135	111	131	134	136	II
ATIH	126	101	121	139	119	125	122	142	I
COR	124	95	117	141	109	135	126	144	III
BRE 97	124	95	119	135	109	133	134	148	II
DAM	124	95	119	137	119	131	120	140	II
DPHT	126	101	117	141	109	127	124	148	I/III
FOU	126	101	117	141	109	127	124	158	I/III

	Immuno-compétents
	SIDA
	Autres causes d'immunodépression

Tableau 14 : répartition des génotypes issus de la combinaison des 8 microsattellites dans les isolats des différentes formes de toxoplasmose acquise

4-3 Typage génétique et toxoplasmoses animales

Nous avons différencié notre population de 23 isolats d'origine animale en fonction de l'espèce animale d'origine : moutons (8 isolats), porcs (7 isolats), chats (3 isolats), un bovin, un lapin, un cobaye, un poulet et un singe.

L'inventaire de ces isolats, l'espèce animale chez laquelle ils ont été isolés, la clinique ainsi que la date et lieu d'isolement sont reportés dans l'annexe 3.

Nous avons essayé de corréliser des génotypes définis par l'association des trois microsatellites les moins polymorphes ou groupes μ SAT (tableau 15 et figure 11), ou des génotypes définis par l'association des huit microsatellites (tableau 16) à une espèce animale donnée.

On voit, que d'après le tableau 15, nous n'avons qu'un seul isolat de groupe μ SAT I dans nos cas de toxoplasmose animale. Cet isolat, CT1, a été isolé chez l'unique bovin de notre population d'animaux.

Mis à part le groupe μ SAT I, on trouve des isolats de groupe μ SAT II chez différentes espèces animales, aussi bien chez le mouton, le porc, le chat, le lapin, le cobaye ou encore le singe. De même, on trouve des isolats de groupe μ SAT III chez le mouton, le porc, le chat ou encore le poulet. Ainsi une espèce animale donnée peut héberger différents génotypes.

Parmi notre population globale de 84 isolats, 4 sont des recombinants de groupe III/I. On voit que la majorité (3 sur 4) ont été isolés chez le porc.

ANIMAUX	Isolats	μ Sat I	μ Sat II	μ Sat III	μ Sat I/III	μ Sat III/I	μ Sat IV
MOUTONS	8 100%		6 75%	1 12,5%			1 12,5%
PORCS	7 100%		3 42,8	1 14,4%		3 42,8%	
CHATS	3 100%		1 33,3%	2 66,6%			
LAPIN	1		1				
COBAYE	1		1				
POULET	1			1			
SINGE	1		1				
BOVIN	1	1					

Tableau 15 : répartition des isolats en groupes μ SAT dans les toxoplasmoses animales

La plus grande fréquence d'isolats de groupe μ SAT II (figure 11) chez les moutons (75%) par rapport aux porcs (42,8%) n'est pas statistiquement significative ($p = 0,23$).

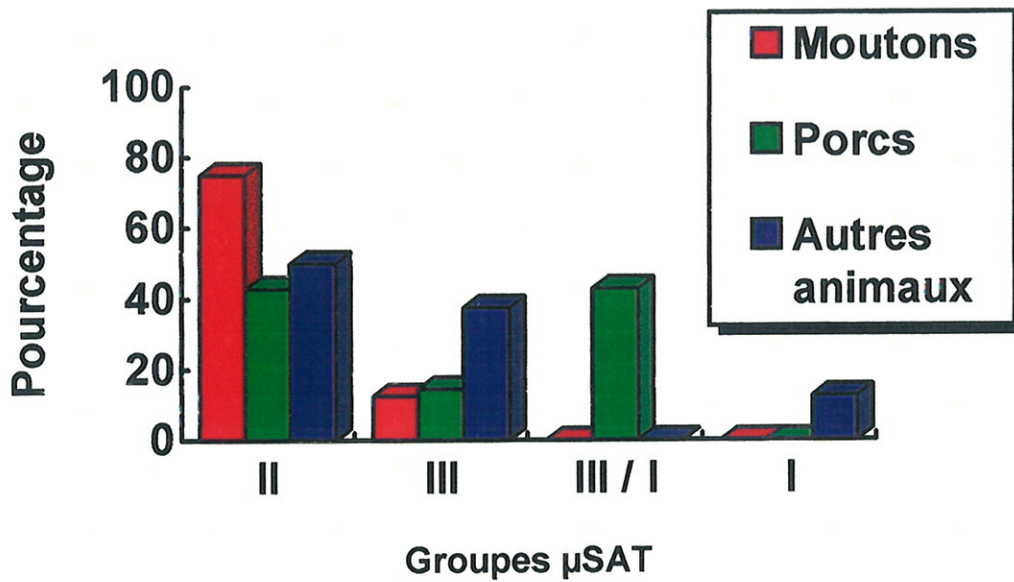


Figure 11 : fréquence des principaux groupes μ SAT en fonction de l'espèce animale

On constate d'après le tableau 16, qu'il n'y a pas d'allèle spécifique d'une espèce animale donnée dans aucun des huit microsattellites.

Mais le pouvoir discriminant élevé du typage par les huit microsattellites montre que S1 et S1K isolés chez le même animal ont deux génotypes différents, et détecte deux allèles différents avec les microsattellites *N60608*, *N82375*, *N83021*, *N61191* et *AA519150* pour l'isolat S3K. En fait l'isolat S3K est constitué de deux génotypes différents dont un correspond au génotype de l'isolat S3. S3 et S3K ont, comme S1 et S1K, été isolés chez le même animal.

STOCK	TUB2	W35487	TgM-A	N60608	N82375	N83021	N61191	AA519150	μSAT
CAST	122	95	119	133	107	145	122	160	IV
M7741	124	95	117	141	109	133	126	144	III
S1K	124	95	119	135	113	131	124	140	II
S2K	124	95	119	135	121	131	134	136	II
S3	124	95	119	135	121	131	134	136	II
S3K	124	95	119	135/139	109/121	131/135	134/144	136/144	II
ME 49	124	95	119	137	109	131	126	142	II
S1	124	95	119	137	109	131	136	146	II
OPA-OPA	124	95	117	139	107	133	124	146	III
P101	124	95	119	137	109	131	130	136	II
P100	124	95	119	137	109	131	130	142	II
PIG 3	124	95	119	137	109	131	134	146	II
P 80	126	95	117	137	109	131	122	138	III/I
SSI 119	126	95	117	137	109	135	122	138	III/I
P 89	126	95	117	137	109	135	122	138	III/I
CH1	124	95	117	133	109	129	132	134	III
CEP	124	95	117	141	109	133	122	146	III
CH2	124	95	119	137	111	131	138	136	II
C56	124	95	117	141	109	133	124	142	III
SQM	124	95	119	135	109	133	130	170	II
76K	124	95	119	137	121	131	136	134	II
BEV	124	95	119	137	121	131	136	134	II
CT-1	126	101	121	139	117	127	122	142	I

	Moutons
	Porcs
	Chats
	Autres animaux

Tableau 16 : répartition des génotypes issus de la combinaison des 8 microsattellites dans les isolats d'origine animale

5- Typage génétique des stocks de la souche RH

On voit dans le tableau 17 que les 3 microsatellites les moins polymorphes donnent avec les 8 stocks les mêmes allèles 126-101-121, ce qui les classe tous dans le groupe μ SAT I.

Le microsatellite *N82375* moyennement polymorphe, mais surtout le microsatellite pourtant très polymorphe *N61191* ne permettent pas de différencier les 8 stocks de la souche RH. En effet ils possèdent tous pour ce dernier microsatellite l'allèle 122 (qui est d'ailleurs l'allèle le plus fréquemment rencontré au sein des stocks de groupe I).

Ce sont les microsatellites moyennement polymorphes *N83021* et *N60608* (3 allèles), mais surtout le microsatellite le plus polymorphe *AA519150* avec 4 allèles qui permettent d'individualiser parmi les 8 stocks de la souche RH **6 génotypes différents** et confirme donc la diversité génétique de la souche RH à travers ses différents stocks entretenus dans des laboratoires divers.

Les stocks PER et GAY isolés à Lyon présentent exactement le même génotype avec les huit microsatellites que la souche RH entretenue à Lyon.

STOCKS		<i>TUB2</i>	<i>W35487</i>	<i>TgM-A</i>	<i>N60608</i>	<i>N82375</i>	<i>N83021</i>	<i>N61191</i>	<i>AA519150</i>
RH Lim	TS4	126	101	121	139	117	127	122	142
RH Lyon	RH Toul	126	101	121	139	117	127	122	144
GAY, PER									
ccRH		126	101	121	139	117	141	122	142
RH88		126	101	121	141	117	127	122	142
RH THU		126	101	121	145	117	129	122	136
RH PSP		126	101	121	145	117	129	122	138

Tableau 17 : génotypes des 8 stocks de la souche RH et des 2 isolats PER et GAY

6- Génotypes identiques

On voit dans le tableau 18 que sur les 93 stocks étudiés, seulement 11 génotypes sont communs à au moins deux stocks avec nos huit microsattellites.

Les stocks aux génotypes identiques ont pour origine aussi bien des cas de toxoplasmoses humaines congénitales ou acquises que des toxoplasmoses animales. Il a été mis en évidence également des génotypes communs à des stocks d'origine humaine et animale.

STOCKS			TUB	W35	Tg	N60	N82	N83	N61	AA51	μSat
			2	487	M-A	608	375	021	191	9150	
RH Lyon	RH Toul	ENT	126	101	121	139	117	127	122	144	I
GAY, PER											
RH Lim	TS4		126	101	121	139	117	127	122	142	I
PIL	FAJI		126	101	121	139	117	129	122	144	I
MOR	GIL	RH88	126	101	121	141	117	127	122	142	I
CHAT	FOUA		124	95	119	137	113	131	134	138	II
BOU	ROD		124	97	119	135	111	131	134	136	II
BOU	REN		124	95	119	135	113	131	124	140	II
BOU	REN		124	95	119	135	121	131	134	136	II
BOU	REN		124	95	119	137	121	131	136	134	II
LEG-NJA	LEG-NJA	NED	124	95	117	141	109	133	126	144	III
BOU	SSV 95		126	95	117	137	109	135	122	138	III/I

	Stocks de la souche RH
	Stocks isolés dans des toxoplasmoses humaines congénitales
BOU LEG-NJA	Stocks isolés dans des toxoplasmoses humaines acquises
	Stocks isolés dans des toxoplasmoses animales

Tableau 18 : stocks ayant des génotypes identiques avec les huit microsattellites.

7- Mise en évidence expérimentale d'une infection mixte chez la souris

Les deux isolats utilisés pour l'infection mixte présentent des allèles bien différenciés avec le microsatellite *N60608* :

- 133 paires de bases pour DEG.
- 141 paires de bases pour NED.

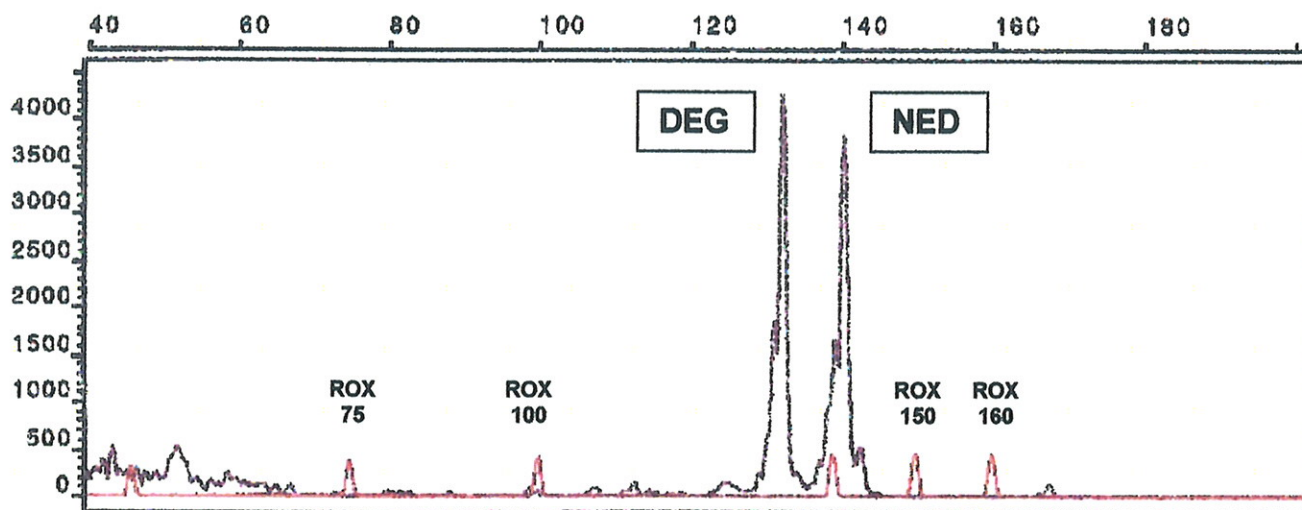
Les données analysées par le logiciel GeneScan[®] après électrophorèse sur séquenceur automatique de l'ADN amplifié par PCR contenant le microsatellite de l'EST *N60608* des stocks DEG et NED à partir de cerveaux de souris coinfectées par ces deux stocks, nous ont permis de retrouver 2 pics de fluorescence à 133 et 141 pb correspondant respectivement à la souche DEG et à la souche NED dans les cerveaux de souris infectées simultanément et 1 heure, 1 jour et jusqu'à 3 jours après l'infection initiale (et ce, que l'infection initiale ait été réalisée avec DEG ou avec NED).

En revanche nous n'avons détecté qu'un seul pic de fluorescence dans les cerveaux de souris infectées 7 jours après l'infection initiale :

- à 133 pb quand l'infection initiale a été faite par DEG.
- à 141 pb quand l'infection initiale a été faite par NED.

Nous avons pu donc montrer la présence d'une infection mixte chez les souris infectées simultanément, à une heure, un jour et au maximum à trois jours d'intervalle.

La figure 12 montre la présence des 2 stocks NED et DEG dans le cerveau de la souris coinfectée simultanément par ces deux stocks à J0.



Pic	Temps de détection (minutes)	Taille (en nombre de bases)	Intensité de fluorescence
ROX 75	14,34	75,00	386
ROX 100	15,28	100,00	410
ROX 139	16,71	139,00	446
ROX 150	17,06	150,00	448
ROX 160	17,39	160,00	455
DEG	16,47	132,40	4311
NED	16,76	140,57	3895

Figure 12 : données analysées par le logiciel GeneScan[®] après électrophorèse sur séquenceur automatique de l'ADN amplifié par PCR contenant le microsatellite de l'EST *N60608* des stocks DEG et NED à partir d'un cerveau d'une souris coinfectedé simultanément par ces deux stocks à J0

IV- Discussion

1) Choix de la technique d'analyse du polymorphisme par les microsatellites

Dans le but de trouver de nouveaux marqueurs qui pourraient apporter plus de polymorphisme dans le typage des isolats de toxoplasmes par rapport aux typages classiques, nous nous sommes intéressés aux microsatellites. En effet, parmi les techniques utilisées dans l'étude du polymorphisme de l'ADN, RFLP ou PCR-RFLP, RAPD ou minisatellites, les microsatellites sont considérés à l'heure actuelle comme étant les plus informatifs, car ils ont un polymorphisme allélique des plus élevés (Kaplan et Delpech 1993); de plus, le polymorphisme observé avec les microsatellites est basé sur un mécanisme radicalement différent des autres techniques.

- **Choix des microsatellites**

Pour qu'un microsatellite soit vraiment polymorphe, il faut que le nombre de répétitions en tandem du motif de base soit supérieur à 12 (plus ce chiffre augmente plus il est polymorphe) et qu'il soit plutôt parfait qu'imparfait (Weber 1990). Parmi le grand nombre de microsatellites retrouvés dans les EST du génome du toxoplasme grâce au BLAST, certains comprenaient des motifs de base trinuécléotidiques, mais dont le nombre de répétitions n'excédait pas 6. D'après les critères précédents, les plus probablement polymorphes n'étaient constitués que de microsatellites à dinucléotides comme motif de bases, car ces derniers étaient parfaits et le nombre de répétitions compris entre 10 et 13.

Nous en avons retenu 6 essentiellement quand nous avons pu discerner dans les séquences des couples d'amorces optimaux selon le logiciel GeneWorks®. Mais bien d'autres EST contenant des microsatellites polymorphes restent à explorer.

Nous avons voulu également utiliser pour notre typage 2 gènes dont la fonction était connue : ceux de la myosine A et de la bêta-tubuline (pour ce dernier nous avons utilisé les amorces décrites par Costa et coll. 1997).

Les microsatellites contenus dans les gènes de la myosine A et de la bêta-tubuline que nous avons amplifiés par PCR sont des dinucléotides dont la répétition est inférieure à 10 mais qui se trouvent dans des introns de ces gènes. Les introns sont des séquences d'ADN non codantes. Ces introns subissent un processus d'excision avant que l'ARN ne sorte du noyau conduisant à la formation d'ARNm fonctionnel qui pourra être traduit en protéines. Ces introns ont des séquences généralement moins conservées entre les organismes que les exons associés (Binas et Johnson 1998). Ainsi dans un gène donné, l'on s'attend à trouver une variabilité génétique plus importante dans les introns que dans les exons.

En fait, avec les huit microsatellites, le critère majeur de polymorphisme allélique est bien le nombre de répétitions en tandem du motif de base, puisque les trois microsatellites les moins polymorphes sont ceux qui en comportaient moins de 11 dans la séquence publiée dans GenBank® : *TUB2* (8), *TgM-A* (9) et l'EST *W35487* (10). On peut aussi noter que les microsatellites les moins polymorphes sont ceux dont le motif de base n'est pas (TA)_n.

L'avantage d'avoir 3 marqueurs peu polymorphes et 5 plus polymorphes est que l'on peut avec les 3 premiers regrouper la population d'isolats en 3 groupes principaux comme la PCR-RFLP ou l'analyse isoenzymatique, tout en pouvant également avec les 5 autres faire du DNA-Fingerprinting comme avec la sonde *BS*.

- **Avantages techniques de la méthode**

Par ailleurs, l'analyse du polymorphisme des microsatellites présente plusieurs avantages techniques. Ce sont ceux d'une PCR, avec les précautions nécessaires, et en cela, ils sont partagés avec ceux de la PCR-RFLP de Howe et Sibley (1995) :

- **la facilité** : c'est une simple réaction de PCR suivie d'une électrophorèse de l'ADN amplifié qui, elle, est automatisée.

- **la rapidité** : en fonction de la disponibilité du séquenceur automatique, on peut en théorie avoir un résultat de typage dans la journée.

- **la sensibilité** : seulement quelques tachyzoïtes ou bradyzoïtes sont en théorie nécessaires pour extraire l'ADN destiné à être amplifié par PCR. Bien que ne l'ayant pas réalisé, nous savons par Costa et coll. (1997) que l'on peut utiliser cette technique directement à partir de prélèvements pathologiques.

Elle reste toutefois moins sensible que la technique de PCR nichée développée par Howe et coll. (1997) qui peut amplifier de l'ADN à partir de seulement 5 tachyzoïtes.

- **la reproductibilité** : nous avons vu que la reproductibilité de notre technique est élevée. Ceci parce que, d'une part, les conditions de PCR pour chaque microsatellite ont été optimisées jusqu'à l'obtention d'une stringence maximale pour l'amplification. En effet pour chaque amplification, nous avons réalisé une gamme de température d'hybridation et sélectionné la température la plus haute possible de fixation des amorces. D'autre part, la mesure de la taille est faite de manière automatique avec un marqueur de poids moléculaire interne systématiquement chargé avec l'ADN amplifié.

- **la spécificité** de la PCR était indispensable, puisque la plupart de nos extractions par Qiagen pour extraire l'ADN de toxoplasmes étaient réalisées à partir de cerveaux et de liquides d'ascite de souris ou de cultures cellulaires d'origine humaine ou féline. L'extraction étant globale, de nombreux ADN autres que ceux du toxoplasme étaient présents lors de l'amplification. A chaque PCR, nous n'avons obtenu qu'une bande en agarose témoignant de l'amplification spécifique de l'ADN de toxoplasme.

Ces avantages contrastent avec la technique isoenzymatique dont la reproductibilité et la spécificité sont bonnes mais qui nécessite des millions de tachyzoïtes et qui est longue.

De même, la RAPD, même si elle bénéficie des avantages d'une technique de PCR, n'est pas satisfaisante quant à la reproductibilité (bandes d'intensité variable, voire nouvelles pour des échantillons identiques) et donc à l'interprétation des résultats.

- **Inconvénients de la méthode**

Cependant quelques problèmes techniques peuvent survenir en amplifiant par PCR des séquences contenant des microsatellites.

- Les **contaminations**, inconvénients de toute PCR, sont évitées par l'emploi de l'UDG qui détruit à 50°C tout ADN amplifié contenant du dUTP avant d'être elle-même détruite à 94°C au moment de la dénaturation, et contrôlées par l'amplification d'un témoin négatif contenant de l'eau au lieu d'ADN.

- L'amplification de dinucléotides répétés en tandem comme TATATATATATATATATA peut donner des artefacts de PCR, avec plusieurs pics séparés par intervalle de deux nucléotides, après passage sur séquenceur automatique.

Ces **pics parasites** sont la conséquence du dérapage de la Taq polymérase sur ces structures répétées : la Taq polymérase, lors de l'élongation, de temps en temps, oublie ou moins souvent rajoute un TA voire deux ou trois. Ceci se traduit autour du pic principal correspondant à la taille exacte du produit PCR par la présence de ces pics parasites. Ce phénomène, inévitable quand on amplifie par PCR des microsatellites (c'est d'ailleurs ce qui se passe in vivo avec la DNA polymérase et qui est à l'origine du polymorphisme des microsatellites) peut être minimisé dans des conditions de stringence maximales, avec notamment du DMSO 5% et en utilisant une Taq de haute fidélité.

Plus le nombre de répétitions du dinucléotide est important, plus ces pics parasites sont fréquents : c'est le cas avec les EST *N61191* ou *AA519150* pour lesquels ce nombre peut dépasser 20. En revanche, ces pics parasites sont quasiment inexistantes avec la bêta-tubuline ou la myosine-A chez lesquels ce nombre n'excède pas 9.

En fait, nous ne retenons que le pic dont la fluorescence était la plus intense pour déterminer la taille de notre produit PCR. La plupart du temps, ce pic se détache nettement des pics parasites.

- Un autre problème plus fondamental est de prouver que pour chaque microsatellite la variation de taille des différents allèles est bien due à des variations dans le nombre de dinucléotides répétés dans le microsatellite même et non à l'addition ou délétion de nucléotides dans les régions flanquant le microsatellite. En théorie, il faudrait séquencer à chaque fois que l'on amplifie un microsatellite de l'ADN d'un stock de *T.gondii*, ce qui rendrait évidemment inutile notre technique.

En fait, ayant choisi des amorces générant des produits PCR inférieurs à 200 nucléotides, nous partons du principe comme Bart-Delabesse et coll. (1998) que, dans ce cas, la probabilité que des mutations survenant en dehors de la séquence du microsatellite puissent jouer un rôle dans le polymorphisme de longueur est négligeable.

- Enfin, la différence de taille (trois nucléotides) observée entre nos produits PCR et les séquences disponibles sur GenBank® ou ceux de Costa et coll. (1997) qui ont également amplifié le microsatellite de la bêta-tubuline avec les mêmes amorces est due au fait que nous utilisons dans la PCR du dUTP et non du dTTP (nous avons constaté une augmentation de deux nucléotides dans la taille du produit PCR chaque fois que nous avons utilisé du dTTP au lieu d'UTP).

La différence restante d'un nucléotide est la marge d'erreur entre les différents séquenceurs automatiques utilisés. Le plus important est que pour un appareil donné, la taille de l'ADN amplifié soit reproductible pour le même stock dans un microsatellite donné.

2- Analyse de la population d'isolats à l'aide des 3 microsatellites les moins polymorphes

Les trois microsatellites les moins polymorphes, ceux du gène de la bêta-tubuline ou *TUB2* (3 allèles), de l'*EST W35487* (2 allèles) et du gène de la myosine A ou *TgM-A* (4 allèles) nous ont permis de classer la majorité de nos isolats en trois groupes principaux : les groupes μ SAT I, II et III.

Dans le but de réaliser un typage simplifié à partir d'un seul marqueur au lieu de six, Howe et coll. (1997) proposent de n'utiliser qu'un seul marqueur en PCR-RFLP : le locus *SAG2*. Le microsatellite du gène de la myosine A et le gène *SAG2* avec amorces et enzymes de restriction décrites par Howe et Sibley (1995) ont en commun d'avoir 3 allèles caractéristiques de chaque lignée clonale. D'ailleurs le typage simplifié des isolats en types I, II et III ne fait plus appel qu'à *SAG2* seul depuis 1995 (Howe et coll. 1997; Owen et trees 1999).

En théorie, un génotypage avec un seul marqueur n'est pas possible, mais avec un parasite comme *T. gondii* dont la multiplication est clonale comme nous l'avons vu, on peut regrouper la grande majorité des isolats dans 3 groupes principaux. Si un seul marqueur a des allèles spécifiques de chaque groupe, on peut se permettre de l'utiliser dans le génotypage (Howe et coll. 1997). On peut imaginer un typage simplifié de notre technique par microsatellites permettant de classer un stock dans un des trois groupes principaux avec une seule PCR sur le gène de la myosine A : un allèle 121 classerait le stock dans le groupe μ SAT I, 119 dans le groupe μ SAT II et l'allèle 117 dans le groupe μ SAT III. L'avantage est un gain de temps et d'argent certain, mais le problème est que l'on n'identifie pas avec un seul marqueur les recombinants, notamment entre les groupes I et III (inconvenient identique quand on n'utilise que SAG2 en PCR-RFLP).

Nous pensons qu'il serait préférable pour l'avenir de simplifier la technique en réalisant une PCR MULTIPLEX permettant d'amplifier à la fois les microsatellites *TUB2*, *W35487* et *TgM-A* en faisant un mix avec les 6 amorces correspondantes. Les allèles 95 et 101 de *W35487* seraient bien différenciés au niveau de la taille des allèles de *TUB2* et *TgM-A* (115, 117, 119, 121, 124 et 126) après passage sur séquenceur automatique. La différence de fluorescence entre *TUB2* (verte) et *TgM-A* (bleue) doit permettre d'attribuer un allèle à l'un ou à l'autre sans ambiguïté.

- **Critères de clonalité**

Nous avons, comme Howe et Sibley (1995) et Dardé (1996, 1997), montré qu'il y a **sur-représentation d'un génotype multilocus** particulier dans notre population globale : le **groupe μ SAT II**. Sur les 84 isolats, 49 appartiennent au groupe μ SAT II (58,3%). Ce chiffre est très proche de ceux de Howe et Sibley(1995) et de Dardé (1996, 1997), respectivement 54 et 60%.

Nous avons également montré une **stabilité des génotypes multi-locus dans l'espace et le temps** : un même génotype qu'il soit de groupe μ SAT I, II ou III peut être isolé à des années d'intervalle, dans des endroits éloignés et même chez des hôtes très différents.

Nos 84 isolats ayant presque tous été typés par analyse isoenzymatique, nos résultats montrent une corrélation étroite entre zymodèmes et groupes μ SAT principaux, et donc, de fait, aux types I, II et III PCR-RFLP de Howe et Sibley (1995). Le groupe μ SAT I équivaut au zymodème 1. Notre typage par microsatellites nous a en plus permis de mettre en évidence deux sous groupes dans les isolats de zymodème 1, correspondant à des recombinaisons entre les types I et III. Le groupe μ SAT II équivaut au zymodème 2 et 4 (sauf CH1 de zymodème 2 classé en groupe μ SAT III). Le groupe μ SAT III équivaut au zymodème 3. Les zymodèmes atypiques correspondent soit à des recombinaisons entre les groupes III et I, soit à des groupes μ SAT atypiques et uniques (IV et V), sauf les zymodèmes 6 et 8 classés dans le groupe III.

Il y a donc **corrélation entre marqueurs génétiques a priori indépendants**. Pour s'assurer du caractère indépendant de ces marqueurs, il faudrait localiser nos microsatellites sur les chromosomes de *T. gondii* par hybridation avec des sondes spécifiques de ces microsatellites sur les chromosomes séparés par électrophorèse en champ pulsé (Sibley et Boothroyd 1992b).

Avec les trois microsatellites les moins polymorphes *TUB2*, *W35487* et *TgM-A*, le nombre de combinaisons différentes possibles des allèles de ces 3 loci (c'est à dire le nombre de génotypes) est de **24**. Sur ces 24 génotypes possibles, seuls 8 sont représentés, dont 3 très rares correspondant à des stocks uniques, ce qui montre une **absence de nombreux génotypes recombinants possibles**. De plus, la grande majorité des 84 isolats (72, soit 86%) appartiennent à seulement trois génotypes ou groupes μ SAT I, II et III. Tout ceci concorde avec les résultats obtenus par PCR-RFLP sur 6 loci (Howe et Sibley 1995) ou par analyse isoenzymatique de 6 systèmes enzymatiques (Dardé 1996, 1997).

On voit donc que nos résultats du typage par microsatellite de nos 84 isolats répondent bien aux critères de multiplication clonale définis par Tibayrenc et coll. (1991). Mais la démonstration que nos trois groupes μ SAT I, II et III correspondent à des lignées clonales ne pourra être validée qu'après traitement statistique de nos données (Tibayrenc 1993, 1998). Nous avons transmis tous nos résultats dans ce but à Michel Tibayrenc au Centre d'Etude sur le Polymorphisme des Micro-organismes (CEPM), UMR CNRS/ORSTOM.

Nous avons comme Howe et Sibley (1995) mis en évidence **des recombinaisons génétiques**, témoins de la multiplication sexuée de *T. gondii*. Elles restent rares. Il s'agit essentiellement de recombinaisons entre les groupes I et III, avec un groupe de 5 isolats présentant 2 allèles sur 3 typiques du groupe μ SAT I (I / III) donc très proche du groupe μ SAT I comme on peut le voir dans l'analyse factorielle des correspondances et un groupe de 4 isolats plus proche du groupe μ SAT III (III / I) avec un seul allèle typique du groupe μ SAT I. Ces rares recombinaisons confirment donc que le mode de multiplication de *T. gondii* est essentiellement clonal, mais pas exclusivement. L'existence de ces isolats recombinants entre les 3 types démontre également que les 3 lignées clonales de *T. gondii* ne sont pas des espèces séparées. L'existence de deux sous-groupes nettement différenciés par l'analyse factorielle des correspondances dans les isolats de zymodème 1, dont l'un correspond à une recombinaison génétique, apporte la preuve formelle que les isolats de zymodème 1 n'appartiennent pas à une espèce séparée.

Nous avons également pu mettre en évidence des différences génétiques dans un même groupe μ SAT, ce qui est compatible avec la théorie clonale (Sibley et Howe 1996) grâce à nos cinq autres marqueurs microsatellites plus polymorphes.

- **Conséquences biologiques et épidémiologiques de la clonalité**

Pour ce qui est de la corrélation avec **la virulence chez la souris**, une des conséquences biologiques de la clonalité, nous avons montré qu'un des 3 marqueurs les moins polymorphes, l'EST *W35487*, possède un allèle parfaitement corrélé à la virulence chez la souris des stocks de zymodème 1 (allèle 121), mais pas à la virulence des stocks de zymodèmes 5, 6, 8 et 12 (allèle 95). L'association de plusieurs de nos marqueurs ne permet pas non plus d'identifier un génotype spécifique des isolats virulents pour la souris.

L'échantillonnage d'isolats ayant déjà été testé par technique isoenzymatique, et les groupes μ SAT I, II et III étant corrélés aux zymodèmes, il est logique que nous retrouvions les mêmes conclusions quant aux aspects épidémiologiques. **Ainsi, le typage des isolats en 3 groupes μ SAT nous a permis de confirmer les données de la littérature concernant typage et répartition géographique, toxoplasmoses animales et humaines.**

Malgré le biais d'échantillonnage de notre population d'isolats (80% proviennent d'Europe, dont 67,5% de France, le reste se partage entre les USA et l'Amérique du sud), on trouve des isolats de groupe μ SAT I, II et III dans ces trois régions du globe, avec une prédominance du groupe μ SAT II en France (67,5%). Ceci confirme qu'il n'y a **pas de spécificité géographique** d'un des trois groupes μ SAT.

L'on sait aussi avec Dardé et coll. (1998) et Bossi et coll. (1998) qu'il existe certainement des génotypes atypiques, ne pouvant être classés dans une des trois lignées clonales, dans des régions isolées de toute influence humaine, ou au contraire dans des régions à forte densité humaine mais pour lesquelles nous ne disposons pas d'isolats (Afrique, Inde, Chine). Nous avons ainsi montré que deux groupes μ SAT atypiques ne proviennent que d'Amérique du sud, l'un chez l'animal en Uruguay (groupe IV) et l'autre en Guyane française chez l'homme (groupe V). On peut supposer que le typage de nombreux isolats provenant de ces régions permettra de mettre en évidence d'autres génotypes soit également atypiques, soit constituant de nouvelles lignées clonales.

Chez l'animal, notre population d'isolats subit là aussi un biais d'échantillonnage puisque les animaux étudiés ne représentent absolument pas la circulation du toxoplasme dans la nature (18 isolats sur 23 ont été isolés de seulement trois animaux : moutons, porcs et chats). De plus la majorité de nos cas proviennent d'infections asymptomatiques chroniques (15 sur 23).

On trouve comme Mondragon et coll. (1998) ou Owen et Trees (1999) une majorité de groupe μ SAT II (56,6%) dans les toxoplasmoses animales, avec cependant une fréquence inférieure (respectivement 100% et 83,7%). Nous avons en effet une proportion de groupe μ SAT III non négligeable (21,8%) comme dans l'étude de Howe et Sibley (1995) avec 47% de type III : la raison en est la même, notre population est biaisée par l'accumulation d'isolats pour typage génétique de groupe III et I plus virulents pour la souris, donc « plus intéressants » à typer que ceux plus fréquemment isolés et avirulents de groupe μ SAT II. Ce biais est absent dans l'étude de Mondragon et coll. (1998) ou d'Owen et Trees (1999).

Nous avons montré que les deux espèces animales les plus représentées (moutons et porcs) peuvent héberger différents génotypes et qu'il n'y avait **pas de génotype μ SAT spécifique d'espèce** (sauf le génotype μ SAT I représenté par l'isolat CT1 isolé par Dubey (1992) chez un animal plutôt résistant à la toxoplasmose : le boeuf). En effet, aucun isolat de groupe μ SAT I n'a été isolé chez les animaux les plus étudiés (moutons et porcs). L'on sait que les isolats de groupe μ SAT I sont très rares dans la nature, et sont notamment exceptionnellement isolés de cas de toxoplasmoses humaines.

Cette absence de groupe μ SAT I dans notre étude ou l'équivalent (type I) dans les études de Mondragon et coll. (1998) et d'Owen et Trees (1999) chez ces deux animaux est à confirmer sur un plus grand nombre d'isolats. Mais on peut imaginer que cela est dû à une élimination plus importante de ce génotype par le système immunitaire de ces deux espèces animales par rapport au groupe μ SAT II. Ainsi s'il n'y a pas de génotype spécifique d'espèce, il peut y avoir des génotypes absents chez certaines espèces. Moutons et porcs étant à l'origine de la majorité des toxoplasmoses humaines du moins aux USA et en Europe par ingestion de leur viande contaminée, cela pourrait tout simplement expliquer la rareté de ce groupe μ SAT I dans les toxoplasmoses humaines dans cette partie du globe.

On peut imaginer qu'il existe d'autres espèces animales n'éliminant pas aussi facilement le génotype μ SAT I que les moutons et porcs et qui soient consommées de façon culturelle par l'homme en dehors de l'Europe ou des USA. Il serait alors intéressant de voir si ce génotype reste rare chez l'homme.

En ce qui concerne la **toxoplasmose humaine**, là encore notre échantillonnage est biaisé d'abord de façon inévitable parce que nos isolats ne proviennent que de cas de toxoplasmoses symptomatiques, mais surtout parce que les isolats d'origine humaine de zymodème 1 sont sur-représentés dans notre population globale (14 sur 84). Du fait de leur rareté, ils nous sont envoyés en priorité pour analyse génétique.

Globalement, la répartition en groupes μ SAT ne déroge pas à la règle et montre une majorité d'isolats du groupe μ SAT II dans les toxoplasmoses humaines (61%) que ce soit dans les toxoplasmoses acquises (52,6%) dont les toxoplasmoses dues au SIDA (71,4%) ou dans les toxoplasmoses congénitales (65,8%) et ce quelle que soit la forme clinique.

Pour ce qui est de la **toxoplasmose congénitale**, on peut rapprocher nos résultats de ceux de Howe et Sibley (1995) qui trouvent près de 60% de type II dans leurs isolats provenant de toxoplasmose congénitale. La plus grande fréquence d'isolats de groupe μ SAT I dans les toxoplasmoses congénitales (18,5%) par rapport aux toxoplasmoses acquises (10,5%) ou animales (4,3%) est également un point commun avec Howe et Sibley (1995), mais cela est dû au même biais d'échantillonnage visant à sélectionner les isolats de type I ou groupe μ SAT I pour l'analyse génétique. Ainsi, Costa et coll. (1997) qui évitent ce biais en partant directement de 37 liquides amniotiques ne trouvent aucun allèle (TG)8 de la bêta-tubuline (équivalent au type I ou au groupe μ SAT I) parmi les 37 isolats étudiés. Ceci sous-entend que la proportion d'isolats de groupe μ SAT II doit être plus importante encore dans les toxoplasmoses congénitales. Ainsi Howe et coll. (1997) par PCR-RFLP avec le seul marqueur SAG2 étudié directement sur 13 liquides amniotiques retrouvent également 100% de type II.

Dans les toxoplasmoses au cours du **SIDA**, notre fréquence de groupe μ SAT II est là aussi proche des résultats de Howe et Sibley (1995) qui trouvent 65% de type II. L'étude de Howe et coll. (1997) qui évite notre biais d'échantillonnage en ne partant que de prélèvements pathologiques (liquide de lavages bronchoalvéolaires, sang ou biopsies) pour typer par PCR nichée et RFLP le seul gène SAG2 de 45 isolats des toxoplasmes présents dans ces échantillons biologiques, retrouve 76% de type II.

Nous avons trouvé des isolats des 3 groupes principaux dans notre échantillonnage de patients sidéens, comme Howe et Sibley (1995) ou encore Howe et coll. (1997) avec leurs types PCR-RFLP, ceci indiquant que la réactivation d'infections toxoplasmiques chez les sidéens est possible avec chacun des trois groupes μ SAT principaux. Il est intéressant de noter que malgré notre biais d'échantillonnage et notre faible nombre d'isolats, notre répartition chez les sidéens des 3 principaux groupes μ SAT I-II-III (14,3%-71,4%-14,3%) est quasiment identique à celle de Howe et coll. (1997) en types PCR-RFLP (13%-76%-11%) sans biais d'échantillonnage.

Ainsi, si nos fréquences de groupes I et III semblent surestimées dans notre population de toxoplasmoses congénitales du fait du biais d'échantillonnage, elles ne le sont pas dans les toxoplasmoses dues au SIDA. On peut donc penser que des isolats de type I ou III sont exceptionnellement retrouvés dans les toxoplasmoses congénitales, alors qu'ils semblent moins rares dans les toxoplasmoses développées au cours du SIDA.

On voit que le regroupement en groupes μ SAT ne fait que confirmer les données déjà obtenues avec les types PCR-RFLP ou les zymodèmes. *Toxoplasma gondii* appartient à trois lignées clonales, le groupe μ SAT II ou type II ou zymodèmes 2 et 4 est sur-représenté dans la nature et est à l'origine de la majorité des toxoplasmoses animales et humaines et ce quelle que soit la forme clinique.

3- Apport du typage par les 8 microsatellites : un polymorphisme plus élevé

En revanche l'association des huit microsatellites nous a permis d'envisager des applications supplémentaires. Le typage génétique avec les huit microsatellites a un pouvoir discriminant élevé permettant de différencier des isolats appartenant à un même groupe μ SAT, mais aussi de mettre en évidence des différences génétiques chez plusieurs stocks d'une même souche.

Nous avons pu ainsi confirmer l'hétérogénéité génétique de stocks de la souche RH.

La souche RH, si elle est la souche de référence de *Toxoplasma gondii* dans les laboratoires du monde entier, la plus utilisée, la plus étudiée, est aussi la plus historique. Elle a été en effet isolée par Sabin, en 1939, à Cincinnati (USA) d'un enfant de six ans mort d'encéphalite toxoplasmique (Sabin 1941). Depuis 1939, la souche RH est entretenue continuellement en culture cellulaire ou par passages intra-péritonéaux de tachyzoïtes chez la souris, tous les 3 à 4 jours, dans de très nombreux laboratoires du monde entier. C'est la souche utilisée dans le Dye-test décrit par Sabin et Feldman (1948), considéré comme la technique de référence dans le diagnostic sérologique de la toxoplasmose pour sa sensibilité et sa spécificité. C'est aussi la souche de choix dans toute approche expérimentale de la toxoplasmose notamment chez la souris (on peut même dire que nos connaissances sur la biologie de *T.gondii* reposent en grande partie sur la caractérisation de la souche RH), et bien sûr, elle est incontournable dans les études portant sur la diversité génétique de *T. gondii*.

Génétiquement, la souche RH appartient au type I défini par l'allèle 1 obtenu après PCR-RFLP sur les loci *SAG1*, *SAG2*, *850*, *ROP1*, *L328* et *62* par Howe et Sibley (1995). L'étude isoenzymatique a montré qu'elle appartient au zymodème 1 défini par le profil électrophorétique de type I dans chacun des 6 systèmes enzymatiques décrit par Dardé et coll. (1992).

La multiplication intensive et continue depuis 60 ans dans de nombreux laboratoires dans le monde entier par passages répétés de tachyzoïtes chez la souris ou en culture cellulaire peut avoir eu pour conséquence de changer les propriétés biologiques ou les caractéristiques génétiques de la souche RH.

Ces lignées ou stocks de la même souche RH entretenus dans des laboratoires différents ne sont pas identiques génétiquement, comme l'ont montré Howe et Sibley (1994). Ces derniers ont analysé 7 lignées différentes de la souche RH, dont TS4 qui est un mutant thermosensible obtenu par Pfefferkorn et Pfefferkorn (1976), par :

- RFLP avec une sonde spécifique du gène à copies multiples *BS* : 5 génotypes différents sont individualisés.
- PCR-RFLP à partir de 3 loci à copies uniques (*SAG1*, *SAG2* et *ROP1*) : c'est le locus *ROP1* qui montre un polymorphisme allélique avec 2 génotypes observés.

Luton et coll. (1995) ont montré des variations comprises entre 0,17% et 0,52% parmi les séquences du gène codant pour l'ARN des petites sous-unités ribosomales de 4 stocks de la souche RH provenant d'Australie, d'Europe, du Canada et des USA. Ils ont également montré, toujours en comparant ces séquences, une différence nette entre les 4 stocks de la souche RH et TS4 au moins aussi grande qu'entre les souches RH de *T.gondii* et une espèce de coccidie proche, *Neospora caninum*.

Notre typage génétique avec huit microsatellites a également retrouvé une diversité génétique de la souche RH. En effet, parmi nos 8 stocks de souche RH, 6 génotypes différents sont représentés. Ces 8 stocks dérivent à priori de la souche RH de Sabin originale.

Cette variabilité génétique de la souche RH pourrait s'expliquer par la multiplication continue de cette souche depuis 60 ans en laboratoire. C'est en effet au moment de la réplication que peuvent se produire des erreurs par dérapage intra-chromatidien de l'ADN polymérase conduisant à un nombre variable de répétitions en tandem des microsatellites (Kaplan et Delpech 1993). Plus le nombre de réplications est important, comme dans le cas de la souche RH, plus ce risque d'erreurs est grand expliquant le polymorphisme génétique observé avec les huit microsatellites.

La capacité du typage par huit microsatellites à discerner des génotypes différents chez des stocks de la souche RH entretenus dans des laboratoires différents, permet de **mettre en évidence des contaminations de prélèvements par la souche RH entretenue dans un laboratoire** en comparant le génotype de « l'isolat » et celui de la souche RH.

A l'occasion de l'analyse de 2 « isolats » de toxoplasmes virulents pour la souris (PER et GAY) isolés de cas de suspicions de toxoplasmoses humaines, il a été possible grâce au pouvoir discriminant du typage par les 8 microsatellites, de mettre en évidence des contaminations par la souche RH entretenue dans le laboratoire d'isolement.

C'est le cas pour « l'isolat » PER obtenu par culture cellulaire à partir d'un liquide céphalo-rachidien chez une femme de 20 ans séronégative VIH ayant une leucémie aiguë réfractaire aux traitements. La recherche de toxoplasmes avait été justifiée par la présence de céphalées importantes chez cette femme, malgré un scanner normal et l'absence de fièvre.

De même pour « l'isolat » GAY obtenu également par culture cellulaire, mais à partir d'un placenta lors d'une suspicion de toxoplasmose congénitale. L'enfant sain à la naissance, ne présentait aucun signe clinique, ni sérologique pouvant témoigner d'une infection. Le problème d'une contamination s'est réellement posé car l'inoculation à la souris du placenta s'est avérée négative.

Ces « isolats » nous ont été envoyés pour être typés : leur appartenance au zymodème 1 ne permet pas de conclure, mais leur génotype avec les huit microsatellites s'avère être le même que celui de la souche RH entretenue au laboratoire d'où proviennent ces « isolats ». Etant donné le pouvoir discriminant élevé de la technique, cette identité génotypique est en faveur d'une contamination par la souche RH.

Le pouvoir discriminant de notre technique avec huit marqueurs différents est important : sur 93 stocks étudiés, 77 ont des génotypes uniques. Il est même possible de démontrer, comme nous l'avons vu, une hétérogénéité génétique au sein d'une même souche, comme la souche RH.

Ainsi, il est raisonnable de penser que, quand deux stocks partagent le même génotype, la probabilité qu'ils soient identiques est grande, même si elle n'est pas absolue : en effet, deux stocks un peu atypiques P89 et SSI119 ont des génotypes identiques avec nos huit microsattellites, alors que l'analyse isoenzymatique avait révélé des différences sur deux systèmes enzymatiques.

Ce pouvoir discriminant élevé du typage avec huit microsattellites permet de discerner des génotypes différents chez des isolats classés dans le même zymodème ou type ou groupe μ SAT comme on l'a vu avec la souche RH de groupe μ SAT I. Mais cela est valable également avec les isolats de groupe μ SAT II. L'on sait que ce groupe μ SAT II est majoritaire dans la nature, notamment chez l'animal. Quand on détecte un isolat de zymodème 2 ou de type II chez un animal, il se peut qu'il y ait en fait deux isolats de génotypes différents mais appartenant tous les deux au zymodème 2 ou type II, c'est à dire une **infection mixte**.

La technique de typage par huit microsattellites peut détecter des infections mixtes naturelles.

Nous avons eu à typer deux isolats provenant d'une épidémie d'avortements dans un troupeau de mouton, la première (S1) en 1977 dans l'Aveyron, la seconde (S3) en 1980 en Haute-Vienne. Les deux isolats ont en commun d'être avirulents pour la souris à l'isolement, avec présence de kystes dans les cerveaux. Mais après plusieurs passages par inoculation intra-péritonéale de kystes à la souris, certaines souris développent une ascite avec présence de rares tachyzoïtes, ce qui témoigne d'un changement de la virulence.

Avant d'être cryoconservés et récupérés pour notre analyse génétique, ces deux isolats étaient donc maintenus soit sous forme de **tachyzoïtes (lignée aiguë)** par inoculation intrapéritonéale de tachyzoïtes 2 fois par semaine (**S1 et S3**) soit sous forme de **kystes (lignée chronique)** par inoculation intra-péritonéale de kystes tous les 6 mois (**S1K et S3K**).

Le typage par les huit microsatellites de S3K avec les marqueurs les plus polymorphes *N60608*, *N82375*, *N83021*, *N61191* et *AA519150* montre la présence de deux pics de fluorescence bien séparés après passage sur le séquenceur automatique. Le génome du toxoplasme, du moins aux stades tachyzoïtes et bradyzoïtes étant haploïde, cela ne peut correspondre qu'à deux produits PCR de tailles différentes ou allèles témoignant de la présence de deux stocks dans l'échantillon, et non de deux allèles d'un même stock.

Pour éliminer une contamination toujours possible en PCR, nous avons refait une PCR avec les huit microsatellites en n'amplifiant dans la série que l'ADN du stock S3K, réextrait par Qiagen®. Les résultats furent identiques.

En fait, il y a bien 2 isolats dans S3K détectés grâce au pouvoir discriminant de nos microsatellites les plus polymorphes. En effet, avec les 3 microsatellites les moins polymorphes un seul pic de fluorescence a été détecté avec S3K, le classant en groupe μ SAT II. Les deux isolats de S3K appartiennent au groupe μ SAT II, mais le faible polymorphisme de ces 3 microsatellites ne permet pas de les différencier, ce qui est également le cas avec un typage classique par zymodèmes ou PCR-RFLP qui les aurait classés respectivement en Z2 et type II.

Les lignées aiguës S3 et S1 à l'origine mélangées dans l'infection mixte respectivement avec les lignées chroniques S3K et S1K ont donc été sélectionnées par passages répétés chez la souris. S3K est le seul témoin de cette infection mixte par la présence de deux génotypes différents dans le cerveau de souris, dont un correspond exactement à la lignée aiguë S3.

On ne connaît pas la fréquence de ces infections mixtes simultanées dans la nature, mais elles semblent rares (Howe et Sibley 1995). Notre technique de typage avec huit microsatellites a permis de mettre en évidence une infection mixte chez deux moutons. Ceci a été possible grâce à son fort pouvoir discriminant supérieur à celui des techniques classiques (PCR-RFLP ou zymodèmes). Ainsi, la rareté de ces infections mixtes tient peut-être simplement au fait que l'on ne sait pas les détecter.

Il est admis que les animaux infectés par une souche de toxoplasme acquièrent une immunité solide empêchant toute nouvelle infection. Pour qu'il y ait infection mixte, il faut donc que la coinfection par deux souches différentes soit simultanée ou ait lieu à très peu de temps d'intervalle avant que cette immunité solide ne se soit mise en place. **Nous avons ainsi voulu savoir de façon plus expérimentale, chez la souris une fois infectée par une souche, quel était le délai maximal de contamination par une autre souche pour qu'il y ait infection mixte.** Nous avons conclu que, pour qu'il y ait infection mixte, la coinfection doit être simultanée ou au maximum avoir lieu entre 3 et 7 jours d'intervalle.

Au delà, l'immunité locale intestinale mise en place empêche toute nouvelle réinfection. Il semblerait qu'il y ait lors d'une nouvelle infection par voie orale, afflux au niveau intestinal de lymphocytes intraépithéliaux intestinaux, TCD8 pour la plupart, élaborés lors de la première infection. Cet afflux empêcherait alors toute nouvelle infection par voie orale (Buzoni-Gatel et coll. 1999).

Quelques essais de ré-infection ont été tentés dans la littérature, mais leur but était différent : il s'agissait de savoir si l'immunité acquise à plus long terme avec l'infection d'une souche empêchait réellement, comme cela est admis, une nouvelle infection avec une autre souche deux mois après l'infection initiale (et non plus quelques jours après). Si les résultats sont discordants (Araujo et coll. 1997; Dao et coll. 2000), il est intéressant de comparer leurs moyens de détection de l'infection mixte avec les nôtres.

Araujo et coll. (1997), 2 mois après avoir infecté oralement des souris avec des kystes de la souche ME49 avirulente pour la souris, ont réinfecté toujours oralement ces souris avec des kystes des souches C56 ou RC56 virulentes pour la souris. La détection de l'infection mixte est basée sur des différences de sensibilité à l'atovaquone : C56 est sensible, RC56 est résistant. Ces auteurs ont montré que des cerveaux de souris chroniquement infectés par une souche (kystes de ME49) peuvent contenir des kystes d'une autre souche après réinfection et que la réponse immune engendrée par la première infection n'est pas suffisante pour prévenir la maladie voire la mortalité suivant la réinfection par une souche virulente (C56) remettant ainsi en cause le dogme défini plus haut.

On peut objecter que le moyen utilisé pour détecter l'infection mixte par Araujo et coll. (1997), bien qu'ingénieux, ne permet pas de mettre en évidence directement la présence de kystes appartenant aux deux souches dans le même cerveau.

Dans une communication récente, Dao et coll. (2000) remettent en cause ce mode de détection d'Araujo et coll. (1997) et proposent d'utiliser pour la réinfection la souche PRU exprimant le gène de la bêta-galactosidase bactérienne (kystes de cette souche colorés en bleu). Ils ont réinfecté par voie orale des souris avec des kystes de PRU-bêta-gal, un, deux et quatre mois après une primo-infection par la souche 76K. Seuls des kystes incolores furent retrouvés (76K). Ils concluent que l'immunité acquise lors de la première infection par 76 K protège d'une ré-infection par PRU en accord avec le dogme défini plus haut.

Si le mode de détection d'une infection mixte décrit par Dao et coll. (2000) est séduisant et indiscutable quand il est positif, on peut se poser des questions quant à sa sensibilité : avant de conclure à l'absence de kystes « bleus » témoignant de l'infection mixte, il faudrait, en théorie, examiner au microscope le cerveau entier des souris.

Si les conclusions des deux travaux sont radicalement différents, cela peut éventuellement provenir du fait que Araujo et coll. (1997) utilisent une souche virulente et une avirulente alors que Dao et coll. (2000) utilisent deux souches avirulentes pour la souris.

On voit que le facteur limitant pour détecter une infection mixte chez un animal est bien le manque de moyens techniques appropriés qui peut être comblé par notre technique de typage par microsattellites, comme nous l'avons démontré.

Après la mise en évidence d'infections mixtes naturelles ou expérimentales avec des isolats aux génotypes différents, **nous nous sommes intéressés aux isolats ayant des génotypes identiques qui pouvaient être liés épidémiologiquement entre eux.**

En ce qui concerne les **toxoplasmoses animales**, nous avons eu à typer les isolats S2K et S3K obtenus tous les deux lors d'épidémies d'avortements dans un troupeau de brebis en Haute-Vienne en 1979 pour la première, et en 1980 pour la deuxième. Il est remarquable de noter que ces deux isolats particulièrement pathogènes pour l'animal et isolés dans la même région à un an d'intervalle partagent exactement le même génotype pour les huit microsatellites, ce qui, avec les réserves déjà évoquées quant au pouvoir discriminant de la technique, laisse penser qu'ils sont identiques et donc qu'une seule et même souche peut être à l'origine des deux épidémies.

Dans les épidémies de **toxoplasmoses humaines** décrites dans la littérature (Benenson et coll. 1982; Debord et coll. 1996; Choi et coll. 1997; mais surtout Bowie et coll. 1997), les différents auteurs ont bien montré l'existence d'épidémies de toxoplasmoses en incriminant soit la viande de porc ou de sanglier crue, soit l'eau de boisson municipale ou issue d'une source, mais, dans l'absolu, ils n'ont pas prouvé qu'une seule et même souche était à l'origine de chaque épidémie. Pour cela, il aurait fallu d'abord isoler les toxoplasmes chez chaque patient, ainsi que ceux contenus dans les kystes présents chez le porc et dans les oocystes présents dans l'eau de boisson. Ensuite, il aurait fallu prouver que les différents isolats aussi bien chez les patients que ceux obtenus dans les sources d'infection incriminées étaient identiques. Si la première condition est particulièrement difficile à réaliser, la seconde peut en revanche être résolue grâce à notre technique de typage génétique par microsatellites.

Nous avons eu à typer 2 isolats GIL et MOR isolés à une semaine d'intervalle en novembre 1988 dans le laboratoire de Parasitologie du Professeur Marjolet du CHU de Nantes et 2 autres isolats CHAT et FOUA isolés à 2 semaines d'intervalle en octobre 1988 au laboratoire du Professeur Garin à Lyon.

Comme on peut le voir dans l'annexe 1, ces isolats ont en commun d'être isolés de toxoplasmoses congénitales chez des femmes dont l'infection a été précoce pendant la grossesse (10 semaines pour GIL et MOR, 15 pour CHAT et FOUA) et qui ont entraîné des interruptions médicales de grossesse avec lésions anatomopathologiques fœtales objectivées au niveau du foie pour GIL et MOR, du cerveau pour FOUA et du foie, rein, cerveau et yeux pour CHAT.

GIL et MOR ont été isolés par inoculation à la souris de foie foetal, tandis que CHAT et FOUA l'ont été à partir des liquides amniotiques. A l'isolement, GIL et MOR montrent une haute virulence pour la souris, alors que CHAT et FOUA entraînent une toxoplasmose latente.

L'analyse isoenzymatique classe GIL et MOR en zymodème 1 (très rarement isolé dans la nature) et CHAT et FOUA en zymodème 2 (le plus fréquemment rencontré notamment dans les toxoplasmoses congénitales). Mais le faible polymorphisme détecté par le typage isoenzymatique ne permet pas de conclure à un quelconque lien épidémiologique entre MOR et GIL d'une part et FOUA et CHAT d'autre part, alors que le typage par les 8 microsatellites montre une identité parfaite entre MOR et GIL et entre CHAT et FOUA.

Le problème d'une éventuelle contamination par une souche RH en ce qui concerne les isolats GIL et MOR virulents pour la souris ne s'est pas posé car ils ont été mis en évidence lors de l'examen anatomopathologique des deux foies foetaux.

On peut donc supposer que les isolats aux profils microsatellites identiques GIL et MOR sont en fait une seule et même souche de *T. gondii* qui a contaminé à très peu de temps d'intervalles deux femmes enceintes vivant dans la région urbaine de Nantes et entraîné dans les deux cas une toxoplasmose congénitale. De même pour CHAT et FOUA à Lyon.

Nous pouvons également remarquer que ces deux souches isolées l'une à Nantes et l'autre à Lyon ont en commun d'avoir donné un tableau clinique identique avec des lésions organiques lors de l'examen anatomo-pathologique (dans le foie pour GIL et MOR, dans le cerveau pour FOUA et dans le foie, cerveau, rein et yeux pour CHAT).

Le fait que, dans deux villes, Lyon et Nantes, il y ait eu des cas de toxoplasmoses congénitales à une ou deux semaines d'intervalle présentant le même tableau clinique avec des souches de génotype identique dans chaque ville peut faire penser que ces toxoplasmoses congénitales surviennent dans un contexte **d'épidémie**. Nous ne savons pas si l'on peut parler d'épidémie de toxoplasmose avec seulement deux cas répertoriés dans chaque ville. Mais on sait que la majorité des toxoplasmoses sont asymptomatiques, et que l'on ne peut isoler des souches que lors de cas symptomatiques comme, par exemple, la toxoplasmose congénitale.

Les cas de toxoplasmoses congénitales que nous décrivons ne sont peut être que la partie immergée de « l'iceberg » de toxoplasmoses asymptomatiques dans la population des deux villes. Ainsi pour estimer l'ampleur réelle de cette épidémie, il aurait fallu entreprendre des sérologies systématiques chez tous les habitants de Lyon et de Nantes, qui auraient peut être montré une augmentation significative des séroconversions dans la population. Il aurait fallu également identifier par une enquête épidémiologique très poussée la source de contamination de ces femmes, isoler la souche et comparer son génotype avec les huit microsattellites aux souches isolées lors des toxoplasmoses congénitales.

Un des buts de l'étude était de mettre en évidence grâce au polymorphisme important détecté par cette technique, une relation entre un génotype particulier et une manifestation clinique chez l'homme. Les seul cas pour lesquels nous avons trouvé une relation concernaient des cas de toxoplasmoses atypiques.

- C'est le cas de l'isolat **VAND** dont le génotype est atypique et unique (zymodème 12 ou groupe **μSAT V**). Il est à l'origine d'une forme particulièrement sévère de toxoplasmosose acquise en forêt de Guyane française chez un sujet parfaitement immunocompétent. On peut penser dans ce cas qu'il y a une inadaptation entre l'homme et ces génotypes atypiques, le rendant hautement sensible à ce genre d'isolats entretenu lors d'un cycle sauvage dans un environnement où l'homme est habituellement absent. En revanche, des génotypes plus classiques qui ont coévolué avec l'homme via un cycle domestique sont mieux adaptés à leur hôte et ne donnent pas lieu à des manifestations cliniques sévères.

- C'est aussi le cas de quatre isolats ayant un génotype original et provenant **de toxoplasmoses avec isolement à partir du placenta et aucun signe d'infection chez l'enfant.** Ces quatre isolats (annexe 11) ont été obtenus dans trois villes différentes par inoculation à la souris de placentas provenant de mères ayant fait une séroconversion toxoplasmique pendant la grossesse (pour trois d'entre elles, relativement tôt). Les mères ont été traitées par spiramycine dans le but d'éviter un passage transplacentaire du toxoplasme.

A la naissance les enfants ne montrent aucun des signes cliniques ou sérologiques témoignant d'une infection.

Du fait de l'isolement à partir du placenta, ils ont été traités pour toxoplasmose congénitale. Mais leurs sérologies sont devenues négatives 9 mois après la naissance et l'étaient encore plusieurs années après, ce qui montre qu'ils n'ont jamais été infectés.

L'on sait que l'infection du placenta n'implique pas forcément l'infection du fœtus. Mais dans la pratique, quand on isole des toxoplasmes d'un placenta, on met toujours en évidence une infection congénitale. Dans le cas contraire il peut s'agir d'une contamination par une souche RH comme on l'a vu avec l'isolat GAY.

Les quatre isolats que nous décrivons ont une haute virulence pour la souris à l'isolement et donc se posait le problème d'une éventuelle contamination par la souche RH entretenue dans les laboratoires d'isolement. Ils appartiennent d'ailleurs au groupe μ SAT I comme la souche RH. Le problème peut se poser pour ENT pour lequel nous ne disposons pas du stock de la souche RH entretenue au laboratoire de Strasbourg en 1984 et qui a un génotype identique avec deux stocks de la souche RH entretenus dans des laboratoires français (Toulouse et Lyon). Mais pour P, PIL et FAJI leur génotype très particulier avec les huit microsattellites les différencie des stocks de la souche RH entretenue dans les laboratoires d'où proviennent ces isolats (souche RH de Toulouse, et les deux stocks de la souche RH de Paris : RH THU et RH PSP) ce qui permet d'exclure une contamination par RH.

Ces 4 isolats ont une très grande homogénéité génotypique. Les différences ne se situent qu'au niveau de deux microsattellites sur huit. PIL et FAJI isolés dans le même hôpital à Paris à 3 ans d'intervalle ont exactement le même génotype. Mis à part ENT, les trois autres isolats ont donc un génotype **original** qui les différencie de tous les autres isolats de groupe μ SAT I que nous avons typés, ce qui est remarquable vu le nombre d'isolats de groupes μ SAT I dans notre population étudiée.

Une des hypothèses permettant d'expliquer cette absence de toxoplasmose congénitale est que ces souches, au profil microsatellite particulier, ne peuvent pas franchir la barrière placentaire et donc, ne peuvent pas infecter le fœtus. On peut aussi penser que ces souches, si elles ont franchi le placenta et ont infecté le fœtus, ont été éliminées entièrement et rapidement par le système immunitaire, contrairement aux souches qui n'ont pas ce génotype particulier.

Ces hypothèses pourraient également expliquer le fait que l'on isole rarement dans la nature, et en particulier dans les cas de toxoplasmose humaine congénitale, des souches du groupe μ SAT I.

CONCLUSION

Le typage des isolats de *Toxoplasma gondii* peut désormais faire appel à la technique des microsatellites. Cette technique de PCR, associée à l'analyse sur séquenceur automatique de la longueur en nombre de bases des produits PCR, amplifie dans notre étude 8 microsatellites contenus dans le génome du toxoplasme. Si elle garde les avantages de la PCR au point de vue technique, elle permet de détecter un degré de polymorphisme différent en fonction du choix des marqueurs microsatellites. En effet, en fonction du nombre de répétitions du motif de base du microsatellite, on peut disposer de marqueurs peu polymorphes si ce nombre est faible ou au contraire de marqueurs très polymorphes si ce nombre est important.

Nous avons utilisé 3 marqueurs peu polymorphes permettant de regrouper une population de 84 isolats en trois groupes μ SAT principaux étroitement corrélés avec les types PCR-RFLP ou zymodèmes déjà décrits. Les conclusions de nos travaux confirment celles de la littérature. C'est pourquoi, il semble inutile de rechercher d'autres microsatellites peu polymorphes.

En revanche avec des marqueurs plus polymorphes nous avons obtenu un pouvoir discriminant élevé permettant de discerner 77 génotypes différents et notamment des stocks différents de la même souche RH. De plus, grâce à la facilité d'emploi, la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité de notre technique, nous avons pu l'utiliser dans des applications nouvelles comme la détection de contaminations de laboratoire par la souche RH, la détection d'infections mixtes naturelles ou expérimentales ou encore la mise en évidence d'un génotype responsable d'épidémies de toxoplasmoses. Mais c'est bien le plus grand polymorphisme apporté par la technique, qui nous a permis de montrer l'existence de génotypes particuliers isolés de placentas sans signes d'infection chez l'enfant. Ceci laisse supposer qu'il existe certainement d'autres génotypes corrélés aux différentes formes de toxoplasmoses humaines. C'est la recherche de nouveaux marqueurs polymorphes contenant des microsatellites et, en particulier, l'identification d'un marqueur corrélé à la pathogénicité chez l'Homme qui doit être l'ambition des travaux ultérieurs.

TROISIEME PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

- Ajioka JW (1998) *Toxoplasma gondii*: ESTs and gene discovery. *Int. J. Parasitol.* 28: 1025-1031.
- Ajioka JW, Boothroyd JC, Brunk BP, Hehl A, Hillier L, Manger ID, Marra M, Overton GC, Roos DS, Wan KL, Waterston R, Sibley LD (1998) Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* 8: 18-28.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ancelle T, Goulet V, Tirard-Fleury V, Baril I, Du Mazaubrun C, Thulliez P, Wcislo M, Carne B (1996) La toxoplasmose chez la femme enceinte en 1995. *BEH* n°51/1996.
- Araujo F, Slifer T, Kim S (1997) Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *J. Parasitol.* 83: 521-522.
- Asai T, Miura S, Sibley LD, Okabayashi H, Takeuchi T (1995) Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 270: 11391-11397.
- Baril L, Ancelle T, Thulliez P, Goulet V, Tirard V, Carne B (1996) Facteurs de risque d'acquisition de la toxoplasmose chez les femmes enceintes en 1995 (France). *BEH* n°16/1996.
- Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S (1998) Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2413-2418.
- Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ (1982) Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.* 307: 666-669.
- Binas M, Johnson AM (1998) A polymorphism in a DNA polymerase alpha gene intron differentiates between murine virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1033-1040.
- Bohne W, Gross U, Heesemann J (1993) Differentiation between mouse-virulent and -avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kiloDalton antigen. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1641-1643.
- Bossi P, Caumes E, Paris L, Dardé ML, Bricaire F (1998) *Toxoplasma gondii* associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3724-3725.
- Bourdillon F, Raffi F, Pradier C (1996) Les principales circonstances de survenue de la toxoplasmose cérébrale chez les patients atteints par le V.I.H en France. *BEH* n°17/1996.
- Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell I, Eng SB, Marion SA (1997) Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet.* 350: 173-177.

Burg JL, Perlman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 141: 3584-3591.

Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR (1998) Multiples cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. Ophthalmology. 105: 1032-1037.

Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Moretto M, Dimier-Poisson IH, Lepage AC, Bout DT, Kasper LH (1999) Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. J. Immunol. 162: 5846-5852.

Caccio S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E (2000) A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology. 120: 237-244.

Carme B, Tirard-Fleury V (1996) La toxoplasmose chez la femme enceinte en France : séroprévalence, taux de séroconversion et niveau de connaissance des mesures préventives. Tendances 1965-1995. Méd. Mal. Infect. 26: 431-436.

Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, Cho SY, Dubey JP (1997) Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 175: 1280-1282.

Costa JM, Dardé ML, Assouline B, Vidaud M, Bretagne S (1997) Microsatellite in the beta-tubuline gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. J. Clin. Microbiol. 35: 2542-2545.

Couvreur J (1999) Le problème de la toxoplasmose congénitale. L'évolution sur quatre décennies. Press. Méd. 28 : 753-757.

Cristina N, Liaud MF, Santoro F, Oury B, Ambroise-Thomas P (1991) A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: Cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. Exp. Parasitol. 73: 73-81.

Dao A, Fortier B, Soete M, Plenat F, Dubremetz JF (2000) Etude de la colonisation du cerveau par *T. gondii* après ré-infestation expérimentale de la souris. Congrès de la société française de parasitologie; étude des systèmes parasites : du satellite au microsatellite. 1-3 mars 2000, Montpellier

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M (1988a) Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 551-558.

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M (1988b) Analyse iso-enzymatique de souches clonées de *Toxoplasma gondii*. Bull. Soc. Française Parasitol. 6: 41-46.

Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M (1992) Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. J. Parasitol. 78: 786-794.

Dardé ML (1996) Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 219: 27-41.

Dardé ML (1997) Apport des typages de souches de toxoplasmes dans l'épidémiologie de la toxoplasmose. Rev. Fr. Lab. 291: 144-148.

Dardé ML, Villena I, Pinon JM, Beguinot I (1998) Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. J. Clin. Microbiol. 36: 324.

Debord T, Eono P, Rey JL, Roué R (1996) Les risques infectieux chez les militaires en opération. Med. Mal. Infect. 26: 402-407.

Devada K, Anandan R, Dubey JP (1998) Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, India. J. Parasitol. 84: 621-622.

Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. Nature. 380: 152-154.

Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD (1997) Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol. Microbiol. 26: 163-173.

Dubey JP, Beattie CP (1988) Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Dubey JP (1992) Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. J. Parasitol. 78: 151-153.

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. J. Parasitol. 81: 48-53.

Dupouy-Camet J, Gavinet MF, Paugam A, Tourte-Schafer C (1993) Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. Méd. Mal. Infect. 23, spécial : 139-147.

Fichera ME, Roos DS (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature. 390: 407-409.

Fortier B, Dubremetz JF (1993) Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. Méd. Mal. Infect. 23, spécial : 148-153.

Fortier B, Ajana F (1993) Toxoplasme et toxoplasmose. Editions techniques. Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), Maladies infectieuses, 8-509-A-10, Pédiatrie, 4-330-A-10, 10 p.

Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, De Jong P, et al (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. Science. 255: 1256-1258.

Gamble HR, Brady RC, Dubey JP (1999) Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. *Vet. Parasitol.* 82: 129-136.

Guo ZG, Gross U, Johnson AM (1997) *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 83: 458-463.

Heintzelman MB, Schwartzman JD (1997) A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 271: 139-146.

Heintzelman MB, Schwartzman JD (1999) Characterization of myosin-A and myosin-C: two class XIV unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 44: 58-67.

Howe DK and Sibley LD (1994) *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. *Exp. Parasitol.* 78: 242-245.

Howe DK and Sibley LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561-1566.

Howe DK, Summers BC, Sibley LD (1996) Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64: 5193-5198.

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD (1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1411-1414.

Jankù J (1923) Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu žluté skvrny v oku normálně velikem a mikrophtalmickém s nálezem parazitů v sítnici. *Casopis Lékarův Českých.* 62: 1021-1027. Translated from the Czech.

Jensen L, Petersen E, Henriksen SA, Dietz HH, Lind P (1998) Monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii* strain 119 identify recently isolated Danish strains as one group. *Int. J. Parasitol.* 28: 1305-1313.

Kaplan JC, Delpech M (1993) *Biologie moléculaire et médecine : de la biologie à la clinique.* 2e ed. Paris : Flammarion Médecine-Science, 1993. 790p.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M et al. (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome. *Nat. Genet.* 8: 221-228.

Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, et al (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat. Genet.* 6: 9-13.

Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science.* 252: 1711-1714.

- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Luton K, Gleeson M, Johnson AM (1995) rRNA gene sequence heterogeneity among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol. Res.* 81: 310-315.
- Makioka A, Ohtomo H (1995) An increased DNA polymerase activity associated with virulence of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 81: 1021-1022.
- Manger ID, Hehl A, Parmley S, Sibley LD, Marra M, Hillier L, Waterston R, Boothroyd JC (1998) Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect. Immun.* 66: 1632-1637.
- Meisel R, Stachelhaus S, Mévélec MN, Reichmann G, Dubremetz JF, Fischer HG (1996) Identification of two alleles in the GRA4 locus of *Toxoplasma gondii* determining a differential epitope which allows discrimination of type I versus type II and III strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 81: 259-263.
- Messina M, Kim S, Sibley LD (1996) A family of dispersed DNA elements that contain GAA repeats in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 81: 247-252.
- Mevelec MN, Chardes T, Mercereau-Puijalon O, Bourguin I, Achbarou A, Dubremetz JF, Bout D (1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 227-238.
- Mondragon R, Howe DK, Dubey JP, Sibley LD (1998) Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol.* 84: 639-641.
- Nagel SD, Boothroyd JC (1988) The α - and β - tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 261-273.
- Nicolle C, Manceaux L (1908) Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci.* 146 : 207-209.
- Nicolas JA, Pestre-Alexandre M (1993) Toxoplasmose : une zoonose transmissible à l'homme. *Méd. Mal. Infect.* 23, spécial : 129-138.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SDJ (1998) Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 3776-3780.
- Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ Jr, Servadio A, Beudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat. Genet.* 4: 221-226.
- Ossorio PN, Schwartzman JD, Boothroyd JC (1992) A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50: 1-15.

- Owen MR and Trees AJ (1999) Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J. Parasitol.* 85: 382-384.
- Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, Remington JS (1994) Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 80: 293-301.
- Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC (1976) *Toxoplasma gondii*: Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp. Parasitol.* 39: 365-376.
- Prince JB, Auer KL, Huskinson J, Parmley SF, Araujo FG, Remington JS (1990) Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen p22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43: 97-106.
- Rabaud C, Dardé ML, Biava MF, Doco-Lecompte T, May T, Canton P (1999) Deux cas de toxoplasmose pulmonaire concomitants au sein d'un couple d'hétérosexuels infectés par le VIH. *Med. Mal. Inf.* 29: 650-652.
- Rinder H, Thomschke A, Dardé ML, Löscher T (1995) Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69: 123-126.
- Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pagés M, Bastien P (1994) Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65: 271-282.
- Rubinstein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Ramesar RS, Old J, Bontrop R, McMahon R, Barton DE, Ferguson-Smith MA (1994) Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nat. Genet.* 7: 525-530.
- Sabin AB (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116: 801-807.
- Sabin AB, Feldman HA (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108: 660-663.
- Shriver MD et al (1997) Microsatellite data support an early population expansion in Africa. *Genome Res.* 7: 586-591.
- Sibley LD, Boothroyd JC (1992a) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359: 82-85.
- Sibley LD, Boothroyd JC (1992b) Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 291-300.
- Sibley LD, Howe DK (1996) Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219: 3-15.

Smith KL, Wilson M, Hightower AW, Kelley PW, Struwing JP, Juranek DD, McAuley JB (1996) Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in U.S. military recruits in 1989: Comparison with data published in 1965. *Clin. Infect. Dis.* 23: 1182-1183.

Splendore A (1908) Un nuovo protozoo parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in moltissimi punti il kalaazar dell'uomo. *Revista da sociedade de ciencias, Sao Paulo.* 3: 109-112. Translated from the Italian.

Su XZ, Carucci DJ, Wellems TE (1998) *Plasmodium falciparum*: Parasite typing by using a multicopy microsatellite marker, PfRRM. *Exp. Parasitol.* 89: 262-265.

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Brenière SF, Dardé ML, Ayala FJ (1991) Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5129-5133.

Tibayrenc M (1993) *Entamoeba, Giardia* and *Toxoplasma*: clones or cryptic species? *Parasitol. Today.* 9: 102-105.

Tibayrenc M (1998) Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28: 85-104.

Wan KL, Blackwell JM, Ajioka JW (1996) *Toxoplasma gondii* expressed sequence tags: insight into tachyzoite gene expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75: 179-186.

Wang R, Kafatos FC, Zheng L (1999) Microsatellite markers and genotyping procedures for *Anopheles gambiae*. *Parasitol. Today.* 15: 33-37.

Ware PL, Kasper LH (1987) Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 55: 778-783.

Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.

Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics.* 7: 524-530.

Windeck T, Gross U (1996) *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. *Parasitol. Res.* 82: 715-719.

Wong SY, Remington JS (1994) Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 18: 853-862.

Wolf A, Cowen D, Paige B (1939) Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verified by transmission to animals. *Science.* 89: 226.

QUATRIEME PARTIE

ANNEXES

ANNEXE 1 : TOXOPLASMOSES CONGENITALES

Devenir de l'infection	Infection maternelle (SG)	Lésions organiques	Isolat	Z	µSat	Date	Origine
?	?	?	PSP 19	Z2	II	1997	Fr (Amiens)
?	26	?	GANGI	Z2	II / I	1984	Belgique
Mort à 1,5 mois	?	Cerveau, yeux	BK	Z1	I	1948	Hollande
Mort à 7 jours	5	Cerveau, yeux	CHAM	Z2	II	1983	Fr (Limoges)
Mort à 9 jours	?	Foie, rate, rein	PRU	Z2	II	1964	Fr (Limoges)
Mort in utéro	6		LGE 96-1	Z4	II	1996	Fr (Limoges)
Mort in utéro	23		C	Z4	II	1981	Fr (Paris)
interruption	10	Foie	GIL	Z1	I	1988	Fr (Nantes)
	10	Foie	MOR	Z1	I	1988	Fr (Nantes)
	?	?	AUD	Z2	II	1988	France
	15	Foie, rein, cerveau, yeux	CHAT	Z2	II	1988	Fr (Lyon)
médicale	15	Cerveau	FOUA	Z2	II	1988	Fr (Lyon)
	13	Foie	FAR	Z2	II	1991	Fr (Limoges)
	13	non	PSP2	Z2	II	1994	Fr (Paris)
	11	Foie, cerveau,	TONT	Z8	III	1992	Fr (Lyon)
	16	Foie, cerveau	MAS	Z5	III / I	1991	Fr (Nice)
de grossesse	19	Calcifications intra-craniennes	GPHT	Z1	I / III	1987	Fr (Paris)
	13	non	LGE 94-2	Z4	II	1994	Fr (Limoges)
	15	non	ROD	Z2	II	1988	Fr (Limoges)
	15	non	CHAMON	Z4	II	1988	France
	18	non	PSP 12	Z4	II	1994	Fr (Paris)
	21	non	MEZ	Z7	II	1999	Fr (Nice)
	23	non	CAL	Z2	II	1989	France
	26	non	CRO	Z2	II	1993	Fr (Limoges)
	28	Chorio-rétinite	REN	Z2	II	1989	France
	29	non	DAS	Z4	II	1992	France
	32	non	SZY	Z2	II	1988	Fr (Limoges)
	34	non	PON	Z2	II	1986	Fr (Limoges)
	36	non	DEG	Z4	II	1987	Fr (Limoges)
	16	Chorio-rétinite	LGE 97-3	Z3	III	1997	Fr (Limoges)
	38	non	NED	Z3	III	1989	France
	?	non	PRE	Z2	II	1993	France
	?	non	LGE 95-1	Z2	II	1995	Fr (Limoges)
?	non	GRE 98-1	Z4	II	1998	Fr (Grenoble)	
Pas d'infection	18	non	ENT	Z1	I	1985	Fr (Strasbourg)
	?	non	PIL	Z1	I	1994	Fr (Paris)
	12	non	P	Z1	I	1984	Fr (Toulouse)
	16	non	FAJI	Z1	I	1991	Fr (Paris)

Enfants non traités.

Enfants traités par Pyriméthamine et sulfadiazine à la naissance.

SG Semaines de grossesse.

ANNEXE 2 : TOXOPLASMOSES ACQUISES

STATUT IMMUN	CLINIQUE	ISOLAT	Z	μSAT	DATE	ORIGINE
Inconnu	Encéphalite	RH	Z1	I	1939	USA
Immunocompétent	Lymphadénopathie	DUCH	Z1	I / III	1971	Belgique
	Méningite	DEGR	Z2	II	1996	Belgique
	Lymphadénopathie	JONES	Z2	II	1986	Angleterre
	Lymphadénopathie	MILIS	Z4	II	1962	Belgique
	Toxo pulmonaire	RUB	Z6	III	1992	Guyane Fr
	Toxo disséminée	VAND	Z12	V	1997	Guyane Fr
SIDA	Encéphalite	ATIH	Z1	I	?	Uruguay
	Encéphalite	BOU	Z2	II	1985	Fr (Limoges)
	Encéphalite	NTE	Z2	II	1990	Allemagne
	Encéphalite	ELG	Z4	II	1990	Fr (Nice)
	Toxo disséminée	SUR	Z2	II	1993	Fr (Nice)
	Toxo pulmonaire	MAN-NJA	Z4	II	1995	Fr (Nancy)
	Toxo pulmonaire	LEG-NJA	Z3	III	1995	Fr (Nancy)
Transplantation rénale	Toxo disséminé	DPHT	Z1	I / III	1993	Fr (Paris)
	Toxo disséminé	FOU	Z1	I / III	1992	Fr (Brest)
	Toxo disséminée	BRE 97	Z4	II	1997	Fr (Brest)
Aplasia thérapeutique	Toxo disséminée	DAM	Z4	II	1993	Fr (Amiens)
Lymphome	Toxo disséminée	COR	Z3	III	1992	Fr (Corbell)

Toxoplasmoses survenant chez des sujets immunodéprimés

STOCKS DE LA SOUCHE RH

Stock	RH88	ccRH	RHLYon	RHToul	RHPSP	RHTHU	RHLim	TS4
Origine	USA	Allemagne (Wurtzburg)	Lyon	Toulouse	Paris	Paris	Limoges Strasbourg	Mutant RH

ANNEXE 3 : TOXOPLASMOSES ANIMALES

ISOLAT	ANIMAL	CLINIQUE	Z	μSAT	ORIGINE	DATE
CT1	Bovin	asymptomatique	Z1	I	USA	1989
ME49	Mouton	asymptomatique	Z2	II	USA	1965
S1 et S1K	Mouton	Toxo congénitale mortelle	Z2	II	Fr (Aveyron)	1977
S3 et S3K	Mouton	Toxo congénitale mortelle	Z2	II	Fr (Hte-Vienne)	1980
S2	Mouton	Toxo congénitale mortelle	Z2	II	Fr (Hte-Vienne)	1979
PIG3	Porc	asymptomatique	Z2	II	Argentine	1993
P100	Porc	asymptomatique	Z2	II	USA (Iowa)	1991
P101	Porc	asymptomatique	Z2	II	USA (Iowa)	1991
76K	Cobaye	encéphalite mortelle	Z2	II	France	1963
BEV	Lapin	asymptomatique	Z2	II	Angleterre	1959
SQM	Singe	Toxo disséminée mortelle	Z4	II	Angleterre	1990
CH2	Chat	oocystes/selles	Z2	II	Fr (Hte-Vienne)	1987
CH1	Chat	oocystes/selles	Z2	III	Fr (Hte-Vienne)	1986
CEP	Chat	oocystes/selles	Z3	III	USA	1977
C56	Poulet	asymptomatique	Z3	III	USA	1961
M7741	Mouton	asymptomatique	Z3	III	USA	1958
OPA-OPA	Porc	asymptomatique	Z3	III	Uruguay	1993
SSI 119	Porc	asymptomatique	Z9	III / I	Danemark	1968
P89	Porc	asymptomatique	Z10	III / I	USA (Iowa)	1991
P80	Porc	asymptomatique	Z11	III / I	USA (Iowa)	1991
CAST	Mouton	Toxo congénitale mortelle	Z7	IV	Uruguay	1993

 Infections mixtes

ANNEXE 3 BIS : ISOLATS SANS RENSEIGNEMENTS

MARTIN de zymodème 1 et groupe μSAT I isolé d'un cas de toxoplasmose humaine.

TG96 de zymodème 4 et groupe μSAT II isolé d'un cas de toxoplasmose humaine.

PMR de zymodème 1 et groupe μSAT I.

WIKTOR de zymodème 1 et groupe μSAT I / III.

**ANNEXE 4 : SEQUENCE DE Y 17507 OU GENE DE LA
MYOSINE A (1960 pb) DU TACHYZOÏTE DE RH**

1 atggcgagca agaccacgtc tgaggagctg aaaacggcca cggcgctgaa gaagaggtcg
 61 tccgatgtcc acgcggtcga ccaactccggc aatgtgtaca aagtgcgtct ttctcgcttt
 121 tctgaaagtc gtttatttg ttccacagtg gatgtcgga aaaccgctgg aaaaccactc
 181 tctgcctctg cccaggtgca gcctcggcgt tcccacgcg caccgaggcg acacgttaac
 241 aggtcgcaga ggacgcgccc cttgagctg tgtaaagcgc gttcctgcat cgtttttcg
 301 aggaaaccgg agagctctaa cgttcagag gggataaata ttccgggtgg acgcgcttcc
 361 gcgtttcgtt gccgtcggaa ggcgtgtgtg cgtggactc cggagcagcc ctgtgtctg
 421 gggctcgggc tgcgtgactc agcgaagact caagttgag aaacatcgca tttctccgg
 481 ttcccagcc gcagcatagg gtcgcactcg ctgtgggtc aatatttoga ggtctcggg
 541 tcgtctctgc tgttcacgga ttgtgtgag tcgtgcttc taccacact tgaactgtg
 601 gtcgcccctc ggcccagaaa gcacatccct ctctctctct ctctgtctcg gttttgccc
 661 gcttttcgaa tgcgtcacc cgactgtgca ccatttttc tctgcccga aaaggccgctc
 721 gtgctctcc ttgccgagc gcactgtgg ttccgaggtc gttcctggc ttccgacccc
 781 ggtgtcggcc gcgagtcacc acgctgttc tctgctttt gtgtattgc atagggatt
 841 caaatctgga cggacttggc gccgtcggg aaggaggagc cggacctgat gtttgccaag
 901 tgcacgtgc aggcggggac agacaagggg aactgacct gcgtccagat ccatccaccg
 961 ggcttcgacg aaccgftcga agtcccgcag gcgaatgcgt ggaacgtaaa cagcctgatc
 1021 gacccatga cgtacggaga catcggcatg ttgcctcaca cgaacattcc ttgcgtctc
 1081 gacttctca aggtgcgctt catgaagaat caaatctaca cgactgcgga cccgctcgtc
 1141 gtcgcatca atcccttccg cgacctcggg aacaccacgc tgcactggat tttcgcgac
 1201 agagacactt tgcacctc caaactcgcg ccccatgtt tctacaccgc cggacgcgag
 1261 ctgcacaacc tccacgccc caacaagtcg caaacgatca tctgtccgg taaaaactg
 1321 gggttctccg taaaaagta acgtgtgtcg aagttccacc tgitcaatcc gatctcgtc
 1381 gattcaagtg tgcagttga atgctgaat gcttgaact gtgtatatgt ggctgtatga
 1441 tgtgtatgga tattctatt gccgcatgct tctcggttc cgtcagatgg cgtcgacatg

 1501 agtttctctg tctctctct tctctctgta tgcattgatg tccctgtcgg tttctccgtg
 1537
 1561 ttcca**TGTG TGTGTGTGTG TGTG**tttga agtcgaagaa gttccgattt atgcactgc

 1621 acgtggactt tttatgtgg tagtttccat cgcatttac ggagctctat ttacatctct
 1661
 1681 acattfacat gcccatatct atatatatat gttcatacgc atatatatat ttatgtatt
 1741 acatatgcat ttgcataat atagtataa atgggtatgt atgtatattt acgtttgagt
 1801 ctgtggatat atttgatgc gtagccacag cgttcttgg acagtgcgta aacgggtcct
 1861 gttcgtttcc aggtgagtct ggcgcgggca agacggaggc gacgaagcag attatgaggt
 1921 atttgcggc ggccaagacg gggctcagtg atttgcggat

ANNEXE 5 : SEQUENCE DE M 20025 OU GENE DE LA BETA-TUBULINE (2534 pb) DU TACHYZOÏTE DE RH

1 agcccttct catttgcgcg ccgagccac cagttgtac aacggccggt ttggtggt
 61 tgcgcctcc gacccaggt gtcggcag aacgtcccg tgcgtggtg ttaggattct
 121 ttctcccc ccgggacagc cgttttgc gacttttc ctctgcgcg ctctggtcc
 181 tttttctg catctccaa aatgagagaa atcgtccacg ttcagggggt ccagtgcggc
 241 aaccaaattg gcgccaagt ttgggaggtc atctcgagc aacacggaat tgatccgggt
 301 agggagaacg ggtccgag tgcgggtcc cggacgctgt ctttctct gtattctcg
 361 tgacagctc gccagttaa atcgagccgt ttccctgtg gagaatcgcg gagaatggac
 421 gagtttccg agctcgagc tgcaccctc cacctcgagc caaccaagt cagcacatt
 481 tgcggggtg tgaccctaag acaccgagc tctacctgc cgtttttc agtcttgca
 541 cacagtgca ccgaaagtca tgttttgc gaagacatc gttgtctgg tgggggaa
 601 ctactctct gttcgcgct atgtgcgag acaggtgtc accctccgca tacgggctc
 661 cgggtgtcc taaaaatgc aggcgcgcg acatcggcca agtctccg tcattcaat
 698
 721 ttgtctcg a**TGTGTGTGT GTGTGTG**gtt tctctctc agaccgtac ctactgtga
 781 gacagtgact tgcagctgga gagaatcaat gttcttaca atgaggccac cggtgagcg
 826
 841 ttgtcccg gtgcgatct catggatct gagccgggca ctatggacag cgttcgcg
 901 ggtccgttg gccagctct ccgccctgac aactctgt tggccaaac tggagcggc
 961 aacaactgg ccaagggtca ctactgag ggtcggagc tgatcgact tgcctgac
 1021 gtcgtccga aggaggtga aggtcgcag tgcctcagg gttccagat caccacagt
 1081 ctggagggg gtaccggtc gggatgggt acgtgtga ttagcaagg ccgagggag
 1141 taccgacc gcatcatgga gacttctc gtgtccgt ccccaagg ctctgacacc
 1201 gttgtcagc cgtacaacgc aacgtctcc gttcaccagc tggtagaa cgcgagca
 1261 gtccaggtga tgcacaacga ggcctatac gacattgt tccgaacact gaagctgacc
 1321 acgcccag atggcgacct gaaccattg gtctccgag ccatgagcg tgtgacctc
 1381 tctctcgt tcccggta gtaaacagc gacctgcga aactgcgg caacctctc
 1441 ccgtccctc gctccact ctctcatt ggtttgct cgtcacgag ccgcgagc
 1501 cagcagacc gcgctcag cgtccccgag ctaccacagc agatgtcga cgaaagaac
 1561 atgatgtcg cctccgacc gcgccagc cgtacctga ctgctccgc catgtccgt
 1621 ggtcgcagt cgaccaagga agtcgagcag cagatgtca acgtccagaa caagaactc
 1681 tctactctg ttgagtgat tccaacaac atgaagtca cgtctgtga catcccccg
 1741 aaggccctca agatgtcgt caccttgc ggaactca ccgcatca ggagatgtc
 1801 aagcgtgtg ccgaccaatt cacagctat ttcaggcga aggttctt gactggtaa
 1861 gttgtacaga gtgtccgag cagtctggt gcagtgtcg ttagagatg gcacattag
 1921 tgtgtctgg ggtacagct tgtctcga gtctgtgg gcatgaatac tgtttttg
 1981 cctcctgt cctatagga cacgggtgaa ggtatggac agatggaatt caccgagcc
 2041 gagtgaaca tgaacacct ggttccgag tctcagcag accaggtac cttcgtct
 2101 tgggtgtg ggttagtgc gctgtctg atacgttcg taatctcat caatactc
 2161 aatgtctat gtgttctc ttcaggagc caccgagag gaagagggag aattcgaca
 2221 ggaagaggg gagatgggt cagaggaagg ccgtagtgg ctttctcat tcaatgca
 2281 cgtctgtac atccgtctc agcagttgc ctgggatcg gacaagtat gtcactgtc
 2341 taaacactc atatacatt tcaaaaaaaaa agaaaaaaaaac ggtctttc tctgtggg
 2401 attatctgt ttgctcgt tcatgtat ctgaggtg taaaagtac ttttgaata
 2461 cgtctcagc tggagtgga ctcaggact cgtctgtg caacaagtgt gctgaatag
 2521 agctgccca gccg

ANNEXE 6 : SEQUENCES DES EST

W 35487 (332 pb)

1 gctcgcagag gaggttcact ggatctctc caaaactaga aaattcgtcg cccgtcctgc
58
61 tgccgtcttt tctctcttc ttggctttCT CTCTCTCTCT CTCTCTCT gt gtcgctgtgn
121 gagtaaaaca gcgcgctct ttgtgggaag ggaacggcat gttccttctg_ttaangtnna
163
181 tctgactct cttgcattt gcgaactcga ggtttccag atatctcgga gtcgctgtc
241 ggaaacaagc gacgttcatt ctggaccgct ccacgctaac gcacggatga ctctgnagtc
301 gaaggacagg cctgtogatt tctgtctcta at

N 60608 (444pb)

1 tcaaacggta tgtgaaatcc tctatacagc ggatggaatc gtcgaggtgc tatccatgcc
36
61 gacatataca ttatatatt **ATATATATAT ATATATATAT ATATAT**ctnc ctagtctac
121 cgcagagagt tgctctctgt aatngctatt ntgtcatca ctcgcacagg tcaaccgttc
179
181 cgggtgtacgt acattgcgcg tagtggacag tccatggttag tgaccgagc gcaggtgcat
241 ttctcagtga cgcgacttag ggtagagagt gatttgcatt ganagcgata tagtgaaca
301 tatccgctg tctgctcgn cttacncggt tgagtagcag ttgcatttct tccgctggga
361 acacaatgtc tggcaactgc atagtatatt atcgacagct gggggggttt gtccgaggnc
421 acacggccga gtnaacggtn ctca

AA 519150 (650 pb)

1 tgtggctgtc gattgccttt tcaatgcata gaaaaaggat gtccggtcaa ttttgctttt
61 ggttcccat cgaccgtgag tannccggtt ggacattcgc gaaggcgtat caaatcgtt
121 tatttactct atatatgttg tctatgctgt cgtcgcATA TATATATATA TATATATATA
137
181 TATgctgga cgatggcagc aagtgcaggt ttgattgagg gacgagaact ccgtttctta
241 atcagttttt tctggctaag accagtaacc gtttatgggt gtgtttctgt ccttccgctc
281
301 gagactttc gtagtccgaa ggcagagttt catttcccg tagaagaata ctgccaatt
361 gatattactc ggtttcgacc tggacgaacc tgaaccattt tgctcaattt tctactcata
421 aaaatgcggc agtgttttac tcaaggccgt agtggatttt cgtgttcgct catcctctcc
481 gagaaatata tgttggttca gtccaagata ccgagctatt tccctctgt ccattctgc
541 ggctgaatg tattgggttc ccggctaacc ataagtcaag ttcctgttca tccgaaaaaa
601 aaaaaactgc aaaaaaaaaa aaagcggggc cgccaccggg tgggaacgct

ANNEXE 6 BIS : SEQUENCES DES EST (SUITE)

N 82375 (316 pb)

1 cttatgcgctg ctgtcagag ttgcaganc gcacgacttg actgcagaag actatttgc
5
61 atagctatct acATATATAT ATATATATAT ATATATATgt ctgtatatgt gcatgcaag
121 gacgcanaca tgtgtagatc tctaaatgcg ttcncact gagcgtcgcc ttncgacta
125
181 tggaaaggaa gaggcagaga ntctgaaag tcgagactcg cacatgctca caagttttg
241 ctgagtcgct tttctgaat ttctctgaga gaagttntca aatgtntca acctccggtg
301 ctcgggggtg tgggct

N 83021 (330 pb)

1 gaagaccggc ngngcatct ctgtggggac gattatttc ttcgcttctc tcttctctg
61 ctggtanact ggcgggagtt agagcacct tcgacgcaga gcttctcgc gctcgggac
120
121 acaacgacac cgctatctcc ctgtctgtAT ATATATATAT ATATATATAT gtacgtatat
181 ntatgtgtgc acgattcatg cgtatctata gatctgcatg tnatacacc aatcggctctg
241 tgtatagaga gatagctaga aaaatancta tgntctacgc tgttcaccca tgatnctat
251
301 ctatctatat atatgatgta ttcaaacctc

N 61191 (370 pb)

1 ngcngcnttg ttggtgagg aaggtggcaa gcgtacacaa ttgccatctt caaaaggctt
61 tagaatgcag tcaccgcgctc ggcagntttg ccacgtgaaa gcagtgacaa aagttgttct
121 gggactgtgc gactcatccc gtatcaccag atcatgttat tgctgttcga tcgncgggtg
139
181 ttgtagatgt acacatagat atctttacaa gcgcTATATA TATATATATA TATATA tgca
241 tcc ttacatc aacatcaggt gagagacaac gatcgggagg cgtagttggt cgctgtggag
265
301 gctaccgggt gnagctgtc gaatactcga tntgagnctt gtgttcgttt tcactcccaa
361 cggagtttaa

ANNEXE 7 : AMORCES UTILISEES

NOM	SEQUENCE		NT	% GC	Tm (°C)
	5'	3'			
1537 Y17507*	CATGTCCCTGTCGGTTTCTC		20	55	61
1661 Y17507	CGTAAATGCGGATGGAACT		20	45	60
698 M20025*	CCAAGTTCTTCCGTCATTTTC		20		
826 M20025	CCTCATTGTAGAACACATTGAT		22		
36 N60608*	GAATCGTCGAGGTGCTATCC		20	55	60
179 N60608	AACGGTTGACCTGTGGCGAGT		20	55	63
137 AA519150*	GTTGTCTATGCTGTCGTGCG		20	55	60
281 AA519150	CACCCATAAACGGTTACTGGTC		22	50	61
58 W35487*	TGCTGCGGTCTTTTCTCTTC		20	50	61
163 W35487	AACATGCCGTTCCCTTCC		18	56	61
139 N61191*	CCGTATCACCAGATCATGTT		20	45	56
265 N61191	CTCTCACCTGATGTTGATGTAA		22	41	55
5 N82375*	TGCGTGCTTGTCAGAGTTC		19	53	59
125 N82375	GCGTCCTTGACATGCACAT		19	53	61
120 N83021*	CACAACGACACCGCTATCTC		20	55	59
251 N83021	CTCTCTATACACAGACCGATTGG		23	48	58

Amorce* : amorce couplée avec un fluorochrome

ANNEXE 8 : REFERENCES DES REACTIFS ET CONSOMMABLES

Qiagen Courtaboeuf, France :

référence 51304 : QIA amp DNA Mini Kit (50).

Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France :

référence T0303Y : Taq DNA polymerase cloned (50 unités) fournie avec le tampon de réaction 10X (100 mM de Tris HCl, 500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂ et 1% de triton X-100).

Roche Diagnostics, Meylan, France :

référence 1934511 : dATP, PCR-Grade (250µl).

référence 1934520 : dCTP, PCR-Grade (250µl).

référence 1934538 : dGTP, PCR-Grade (250µl).

référence 1934546 : dTTP, PCR-Grade (250µl).

référence 1934554 : dUTP, PCR-Grade (250µl).

référence 1269062 : UDG (25 unités).

référence 821705 : marqueur de poids moléculaire V de 8 à 587 bp (250 µg/ml).

Prolabo, Nogent sur Marne, France :

référence 23 486-297 : DMSO 99% min (1litre).

Polylabo, Strasbourg, France :

référence 69744 : microtubes 0,2 ml en barrettes de 8.

Eurobio, Les Ullis, France :

référence 018648 : gel d'agarose de haute résolution, qualité biologie moléculaire Résophor (100g).

Perkin Elmer, Courtaboeuf, France :

référence 402838 : polymère analyse génétique POP4 (5ml).

référence 402839 : capillaire 47 cm / 50 µm pour analyse génétique POP4 (5).

référence 401735 : Genescan 350 red dye labelled ou Rox 350 (400 µl).

référence 401957 : tubes à échantillon de 0,5 ml (500 tubes).

référence 401956: septa pour tubes à échantillon de 0,5 ml (500 septa).

référence 400596: formamide désionisé.

ANNEXE 9 : CONDITIONS DE PCR

	<i>TUB2</i>	<i>N</i> 60608	<i>AA</i> 519150	<i>W</i> 35487	<i>N</i> 61191	<i>N</i> 82375	<i>N</i> 83021	<i>TgM-A</i>
Tampon 10X	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
dNTP	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
DMSO	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
Amorce*	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.4 µl	0.52µl	0.8µl	0.62µl	0.25µl
Amorce	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.45µl
TAQ	0.12µl	0.12µl	0.12µl	0.12µl	0.12µl	0.12µl	0.12µl	0.12µl
UDG	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl
H2O	11.88µl	11.88µl	11.88µl	11.68µl	11.56µl	11.28µl	11.46µl	11.58µl
Vol MIX	17.6µl	17.6µl	17.6µl	17.6µl	17.6µl	17.6µl	17.6µl	17.6µl
ADN	2.4 µl	2.4 µl	2.4 µl	2.4 µl	2.4 µl	2.4 µl	2.4 µl	2.4 µl
Vol total	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl

Cycles réactionnels

2 minutes à 50°C (action de l'UDG).

3 minutes à 94°C (dénaturation de l'ADN).

35 cycles de

- 30 secondes à 94°C (dénaturation de l'ADN).
- 30 secondes d'hybridation à :
 - 52 °C pour Y17507.
 - 55 °C pour N60608.
 - 54°C pour AA519150, TUB2, W35487, N61191, N82375, et N83021.
- 30 secondes à 72°C (élongation).

10 minutes à 72°C pour l'élongation finale.

ANNEXE 10 : TYPAGE PAR LES HUIT MICROSATELLITES

DES 93 STOCKS

STOCK	TUB 2	W 35487	TgM-A	N60608	N82375	N83021	N61191	AA519150	μSAT
PMR	126	101	121	139	115	129	122	144	I
TS4	126	101	121	139	117	127	122	142	I
CT-1	126	101	121	139	117	127	122	142	I
ENT	126	101	121	139	117	127	122	144	I
GAY	126	101	121	139	117	127	122	144	I
PER	126	101	121	139	117	127	122	144	I
RH Lyon	126	101	121	139	117	127	122	144	I
RH STR	126	101	121	139	117	127	122	142	I
RH Toul	126	101	121	139	117	127	122	144	I
PIL	126	101	121	139	117	129	122	144	I
FAJI	126	101	121	139	117	129	122	144	I
BK	126	101	121	139	117	137	122	142	I
ccRH	126	101	121	139	117	141	122	142	I
ATIH	126	101	121	139	119	125	122	142	I
P	126	101	121	139	119	129	122	144	I
MARTIN	126	101	121	139	123	127	124	142	I
RH 88	126	101	121	141	117	127	122	142	I
GIL	126	101	121	141	117	127	122	142	I
MOR	126	101	121	141	117	127	122	142	I
RH THU	126	101	121	145	117	129	122	144	I
RH PSP	126	101	121	145	117	129	122	146	I
DPHT	126	101	117	141	109	127	124	148	I/III
FOU	126	101	117	141	109	127	124	158	I/III
WIK	126	101	117	141	109	127	124	164	I/III
GPHT	126	101	117	141	109	127	126	152	I/III
DUCH	126	101	117	141	109	129	126	146	I/III
P 80	126	95	117	137	109	131	122	138	III/I
SSI 119	126	95	117	137	109	135	122	138	III/I
P 89	126	95	117	137	109	135	122	138	III/I
MAS	126	95	117	137	109	161	130	134	III/I
GH1	124	95	117	133	109	129	132	134	III
RUB	124	95	117	137	107	133	120	136	III
TONT	124	95	117	137	109	133	122	158	III
OPA-OPA	124	95	117	139	107	133	124	146	III
LGE97-3	124	95	117	141	109	133	122	140	III
CEP	124	95	117	141	109	133	122	146	III
C55	124	95	117	141	109	133	124	142	III
LEG-NJA	124	95	117	141	109	133	126	144	III
M7741	124	95	117	141	109	133	126	144	III
NED	124	95	117	141	109	133	126	144	III
COR	124	95	117	141	109	135	126	144	III
CAST	122	95	119	133	107	145	122	160	IV
VAND	126	95	115	137	109	129	126	154	V

Allèle typique du groupe μSAT I

119 Allèle typique du groupe μSAT II

117 Allèle typique du groupe μSAT III

Allèle atypique

ANNEXE 10 : SUITE

STOCK	TUB 2	W35487	TgM-A	N60608	N82375	N83021	N61191	AA519150	μSAT
GANGI	124	95	121	133	109	133	138	138	II/I
76K	124	95	119	137	121	131	136	134	II
AUD	124	95	119	133	121	131	144	148	II
BEV	124	95	119	137	121	131	136	134	II
BOU	124	95	119	135	111	131	134	136	II
CAL	124	95	119	135	109	135	122	152	II
CH2	124	95	119	137	111	131	138	136	II
CHAM	124	95	119	137	115	131	150	142	II
CHAT	124	95	119	137	113	131	134	138	II
CRO	124	95	119	131	121	133	124	136	II
DAM	124	95	119	137	119	131	120	140	II
DEGR	124	95	119	141	109	131	122	134	II
FAR	124	95	119	139	109	135	142	146	II
FOUA	124	95	119	137	113	131	134	138	II
JONES	124	95	119	137	109	131	132	142	II
LGE95-1	124	95	119	137	109	135	138	142	II
ME 49	124	95	119	137	109	131	126	142	II
MEZ	124	95	119	137	109	133	132	144	II
NTE	124	95	119	135	111	131	138	146	II
P100	124	95	119	137	109	131	130	142	II
P101	124	95	119	137	109	131	130	136	II
PIG 3	124	95	119	137	109	131	134	146	II
PON	124	95	119	137	113	131	136	146	II
PRE	124	95	119	137	111	131	138	138	II
PRU	124	95	119	137	115	131	160	142	II
PSP19	124	95	119	135	109	133	122	146	II
PSP2	124	95	119	137	109	135	132	140	II
REN	124	95	119	135	113	131	124	140	II
ROD	124	95	119	135	111	131	134	136	II
S1	124	95	119	137	109	131	136	146	II
S1K	124	95	119	135	113	131	124	140	II
S2K	124	95	119	135	121	131	134	136	II
S3	124	95	119	135	121	131	134	136	II
S3K	124	95	119	135/139	109/121	131/135	134/144	136/144	II
SUR	124	95	119	135	107	135	124	156	II
SZY	124	95	119	135	107	131	128	146	II
BRE 97	124	95	119	135	109	133	134	148	II
C	124	95	119	145	109	133	124	140	II
CHAMON	124	95	119	135	109	131	126	136	II
DAS	124	95	119	139	117	131	128	138	II
DEG	124	95	119	133	111	131	134	142	II
ELG	124	95	119	137	131	131	142	144	II
GRE98-1	124	95	119	135	107	133	140	154	II
LGE96-1	124	95	119	135	109	133	122	150	II
LGE94-2	124	95	119	139	109	131	122	136	II
MAN-NJA	124	95	119	137	119	133	134	142	II
MILIS	124	95	119	135	107	133	132	136	II
PSP12	124	95	119	135	117	133	122	142	II
SQM	124	95	119	135	109	133	130	170	II
TG96	124	95	119	133	109	133	122	144	II

ANNEXE 11 : P, ENT, FAJI ET PIL

	P	ENT	FAJI	PIL
Date	1984	1984	1991	1994
Lieu d'isolement	Toulouse Pr Séguéla	Strasbourg Pr Kien	Paris pitié salpêtrière	Paris pitié salpêtrière
Séroconversion maternelle (semaines de grossesse)	12 semaines	18 semaines	16 semaines Grossesse gémellaire	Toxoplasmose ancienne réactivée ? Tuberculose
Traitement de la mère	Spiramycine	Spiramycine	?	?
Origine de l'isolement	Placenta	Placenta	Placenta unique	Placenta
Mode d'isolement	Souris	Souris	Souris	Souris
Sérologie de l'enfant à la naissance	IgM négatif		IgM négatif IgA négatif idem à 10 jours	IgM négatif IgA négatif idem à 10 jours
Traitement de l'enfant	Adiazine + Malocide	Adiazine + Malocide	Adiazine + Malocide	Adiazine + Malocide
Suivi sérologique de l'enfant	Sérologie négative à 1 an	Sérologie négative à 9 et 12 mois	Sérologies négatives à 9 mois	Sérologie négative à 7, 10 et 14 mois
Suivi clinique de l'enfant			Aucun signe à 9 mois	Aucun signe à 14 mois

Résumé

Le typage des isolats de toxoplasmes est basé essentiellement sur l'analyse isoenzymatique de 6 systèmes enzymatiques et sur des techniques de PCR-RFLP à partir de 6 loci à copies uniques qui permettent de regrouper les isolats typés en 3 grands groupes considérés comme des lignées clonales. Le degré de polymorphisme apporté par ces deux techniques est cependant trop faible, ce qui limite les applications du typage génétique. En particulier, on ne peut pas établir de corrélations avec les différentes manifestations cliniques chez l'homme.

Dans le but de trouver de nouveaux marqueurs qui pourraient apporter plus de polymorphisme dans le typage des isolats de toxoplasmes, nous nous sommes intéressés aux microsatellites. Ces derniers largement utilisés dans l'étude du polymorphisme de l'ADN ont jusqu'ici été peu employés chez le toxoplasme. La recherche des microsatellites dans le génome du toxoplasme a été effectuée grâce au BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Parmi le grand nombre de microsatellites retrouvés dans GenBank[®], 8 microsatellites à 2 nucléotides ont été sélectionnés : deux (TG)_n, un (CT)_n et cinq (TA)_n. Parmi ces 8 microsatellites, 2 appartiennent à des gènes dont la fonction est connue (béta-tubuline et myosine), les 6 autres proviennent d'EST (Expressed Sequenced Tags). Des séquences d'ADN inférieures à 200 nucléotides, comprenant les microsatellites, ont été amplifiées séparément par PCR avec des amorces fluorescentes pour 93 stocks. L'électrophorèse des séquences amplifiées a été réalisée sur séquenceur automatique et les données analysées par Genescan[®] software afin de déterminer la longueur de chaque séquence à un nucléotide près.

Le polymorphisme allélique retrouvé va de 2 à 16 allèles selon les microsatellites. L'analyse de la totalité des résultats retrouve les 3 grands groupes décrits plus haut. En fait, l'association des 3 microsatellites les moins polymorphes (béta-tubuline, myosine, et l'EST W35487) permet aisément à elle seule de distinguer les 3 groupes principaux ou lignées clonales. Elle permet également d'envisager des recombinaisons génétiques entre ces différents groupes.

Avec les 8 microsatellites, le degré de polymorphisme plus important permet quasiment d'individualiser les isolats, voire de mettre en évidence une hétérogénéité génétique de la souche RH à travers ses différents stocks. Dans les limites du pouvoir discriminant de la technique, il est possible de détecter des contaminations de laboratoire, la responsabilité d'une souche particulière dans une épidémie de toxoplasmose et les infections mixtes aussi bien naturelles qu'expérimentales chez l'animal. Concernant les relations avec la pathologie humaine, certains isolats au profil microsatellite particulier proviennent de cas atypiques de toxoplasmose.

MOTS-CLES : *Toxoplasma gondii*, typage génétique, microsatellites, polymorphisme.