

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2007

N°40

**MEMOIRE
DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 24 octobre 2007

par Mme Marjorie DRILLON-CHARPENTIER épouse GAS

**Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 23 janvier 2003 tient lieu de :**

**THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Intérêt de la PCR effectuée sur le placenta pour le diagnostic de la
toxoplasmose congénitale : étude de 86 dossiers de
séroconversions toxoplasmiques**

Président :

M. Patrice Le Pape, Professeur de Parasitologie - Mycologie, Pharmacie

Membres du Jury :

Mme F. Gay Andrieu, Maître de conférences en Parasito-Mycologie, Médecine

Mme C. Boscher, Praticien Hospitalier Pédiatrie, Médecine

M. G. Boog, Professeur de Gynécologie-Obstétrique, Médecine

M. D. Lepelletier, Praticien Hospitalier Santé Publique, Médecine

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS	3
TABLE DES ILLUSTRATIONS	4
INTRODUCTION	6
1^{ère} partie : Etude bibliographique : toxoplasme et toxoplasmose	7
I. Généralités	8
1. Le parasite	8
1.1. Taxonomie.....	8
1.2. Morphologie	8
1.3. Cycle.....	11
2. Toxoplasmose humaine	13
2.1. Epidémiologie	13
2.2. Modes de contamination de l'homme	15
2.3. Clinique	17
II. Toxoplasmose congénitale	19
1. Epidémiologie	19
2. Législation en Europe et en France	19
3. Physiopathologie	22
3.1. Transmission materno-fœtale	22
3.2. Atteinte fœtale	25
4. Clinique	31
5. Traitements.....	34
III. Diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale	36
1. Diagnostic de la séroconversion maternelle	36
1.1. Techniques utilisant des antigènes figurés	37
1.2. Techniques utilisant des antigènes solubles	39
1.3. Interprétation des sérologies maternelles	42
1.4. Datation de la contamination maternelle.....	48
2. Diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale	50
2.1. Analyse du liquide amniotique.....	50
2.2. Suivi échographique	65
2.3. Interprétation des résultats	67
3. Diagnostic néonatal	68
3.1. Bilan clinique	68
3.2. Bilan paraclinique : imagerie	70
3.3. Bilan parasitologique.....	70
4. Prise en charge de la séroconversion maternelle.....	78
4.1. Prise en charge d'une séroconversion pergravidique	78
4.2. Suivi des enfants.....	82
2ème partie : Etude personnelle :	90

Bilan de 86 cas de séroconversions pergravidiques survenues entre juillet 2004 et octobre 2005.....	90
Place de la PCR effectuée sur le placenta par rapport aux autres techniques utilisées.....	90
I. PATIENTS, MATERIEL ET METHODES	91
1. Patients	91
2. Analyse du placenta	92
3. Analyse des dossiers.....	97
3.1. Liste des informations nécessaires	97
3.2. Contacts établis	98
3.3. Récapitulatif des informations	99
II. RESULTATS	100
1. Diagnostic final des enfants à l'âge de 1 an	100
2. Place de la PCR effectuée sur le placenta par rapport à l'inoculation aux souris	107
III. DISCUSSION	110
1. Reconstitution des dossiers de nos patients en vue d'obtenir le diagnostic définitif de l'enfant	110
2. Evaluation de la PCR du placenta	116
CONCLUSION.....	121
ANNEXES.....	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	132

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : anticorps

AFSSA : association française de sécurité sanitaire liée à l'alimentation

Ag : antigène

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

ETF : échographie transfontanellaire

FO : fond d'œil

G : grossesse

LA : liquide amniotique

LBA : lavage broncho-alvéolaire

M : million

UI : unités internationales

PCR : polymerase chain reaction

SA : semaines d'aménorrhée

SC : séroconversion

SPC : semaines post-conceptionnelles

TC : toxoplasmose congénitale

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : 1a : Photo d'un tachyzoïte de <i>T.gondii</i> (X400) d'après Anofel. ; 1b : Schéma du tachyzoïte d'après Fortier et Ajana, 1993	9
Figure 2 : Kyste à l'état frais, rompu de <i>T.gondii</i> , d'après Anofel.	10
Figure 3 : Oocyste de <i>T.gondii</i>	10
Figure 4 : Schéma du cycle de <i>T.gondii</i> , d'après Dubey et Beatty, 1988.	11
Figure 5 : Séroprévalence de la toxoplasmose selon le département d'habitation (1995).	14
Figure 6 : Sources et modes de contamination humaine (Evans 1992).	17
Figure 7 : Risque de transmission et gravité de la toxoplasmose congénitale en fonction du terme, d'après Anofel.	24
Figure 8 : Risque d'infection congénitale en fonction de l'âge gestationnel lors de la séroconversion (Dunn, Wallon et coll. 1999).	25
Figure 9 : Risque de développer des signes cliniques avant l'âge de 3 ans selon l'âge gestationnel (SA) lors de l'infection fœtale (Dunn, Wallon et coll. 1999).	27
Figure 10 : Imagerie de toxoplasmose cérébrale.	31
Figure 11 : Lésion de chorioretinite.	33
Figure 12 : Conduite à tenir devant une sérologie toxoplasmique chez la femme enceinte immunocompétente (adapté de Bessières, 2003)	47
Figure 13 : Principe de la PCR en temps réel utilisant la méthode TaqMan [®]	56
Figure 14 : Courbes de résultats de PCR quantitative en temps réel.	58
Figure 15 : Récapitulatif des différents protocoles de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de l'ADN de <i>T.gondii</i> . (Maubon, Brenier-Pinchart et coll. 2007)	59
Figure 16 : Répartition des infections congénitales selon leur gravité en fonction de la concentration de toxoplasmes dans le liquide amniotique et de l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle	61
Figure 17 : Probabilité d'avoir un enfant atteint de TC	63
Figure 18 : Stratégie de diagnostic d'une toxoplasmose congénitale devant une séroconversion ou une infection toxoplasmique récente pendant la grossesse (d'après Bessières, 2003)	79
Figure 19 : Etapes du diagnostic de la toxoplasmose congénitale chez l'enfant et sa prise en charge (Romand, 1998).	83
Figure 20 : Protocole de traitement des nouveaux-nés selon les situations (Réseau 2006).	86
Figure 21 : PCR en temps réel pour la détection du gène B1 (Lin, Chen et coll. 2000).	97

Liste des tableaux

Tableau 1 : synthèse de 2 études montrant atteintes maternelle et fœtale en fonction de l'âge gestationnel au moment de la contamination.	28
Tableau 2 : manifestations cliniques de la toxoplasmose congénitale pour 327 enfants suivis pendant une quinzaine d'années (Wallon, Kodjikian et coll. 2004).	33
Tableau 3 : évolution clinique des 88 fœtus ayant eu une PCR du LA positive, en regard de l'âge gestationnel lors de l'infection maternelle (Romand, Chosson et coll. 2004).	62
Tableau 4 : revue de plusieurs études rapportant les résultats de la PCR sur le LA.	65
Tableau 5 : comparaison des différentes techniques de diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale (Morin 2002).	77
Tableau 6 : enfants atteints de TC, soit 13 dossiers. Les dossiers en gras correspondent à ceux pour lesquels le diagnostic a pu être posé plus tôt grâce à l'analyse du placenta.	101
Tableau 7 : enfants non atteints de toxoplasmose congénitale, soit 42 dossiers.	105
Tableau 8 : résultats de l'analyse du placenta par PCR et inoculation aux souris chez les enfants TC+.	107
Tableau 9 : résultats de l'analyse du placenta par PCR et inoculation aux souris chez les enfants TC-.	107
Tableau 10 : résultats obtenus avec la PCR en temps réel sur le placenta, chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale (TC+) ou non (TC-).	108
Tableau 11 : résultats obtenus avec l'inoculation aux souris du placenta, chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale (TC+) ou non (TC-).	108
Tableau 12 : comparaison des performances de nos 2 techniques, PCR et inoculation	109
Tableau 13 : récapitulatif des résultats de la PCR et de l'inoculation pour nos 55 patients.	116

INTRODUCTION

La toxoplasmose, parasitose cosmopolite due à un protozoaire, *T. gondii*, est une pathologie en général bénigne dans sa forme classique du sujet immunocompétent mais pouvant être redoutable chez l'immunodéprimé ou en cas d'atteinte fœtale lors de la séroconversion chez une femme enceinte. En France, environ 1 femme sur 2 en âge de procréer n'est pas immunisée. Entre 0,4 et 1,6 % d'entre elles feront une séroconversion pergravidique, conduisant à 700 à 2100 cas de toxoplasmose congénitale par an. Le diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale est très important pour permettre une prise en charge la plus rapide possible du nouveau-né. Le diagnostic biologique repose, en période prénatale, sur l'analyse du liquide amniotique puis, en période néonatale, sur des méthodes directes de recherche de *T.gondii* dans le placenta et le sang de cordon, et indirectes par des analyses sérologiques effectuées chez l'enfant et sa mère. Les méthodes directes reposaient jusqu'à maintenant sur l'inoculation du placenta (voire du sang de cordon) à des souris mais pourraient être complétées par des techniques de biologie moléculaire. A titre expérimental, la PCR sur le placenta est réalisée au CHU de Nantes depuis 2004, en parallèle à l'inoculation à la souris, de manière prospective. Ses résultats ne sont donc pas rendus aux cliniciens

Le but de notre travail était de comparer les résultats de la PCR sur le placenta à ceux de l'inoculation à la souris, et de voir quelle pourrait être la place de cette technique dans l'arsenal diagnostique de la toxoplasmose congénitale.

Pour évaluer cette technique de PCR, il était préalablement nécessaire de connaître avec certitude le diagnostic définitif de l'enfant (toxoplasmose congénitale ou non). Or la prise en charge, en routine, des séroconversions toxoplasmiques fait intervenir différents praticiens sans qu'il n'existe une centralisation des informations et une synthèse des dossiers. Notre travail s'est donc articulé en 2 parties :

- une première étape de recueil des informations pour une synthèse des dossiers permettant, pour chaque enfant, de connaître le diagnostic définitif.
- une deuxième étape comportant une analyse des résultats de la PCR par rapport à l'inoculation à la souris et une réflexion sur la place de cette technique dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

**1^{ère} partie : Etude bibliographique : toxoplasme et
toxoplasmose**

I. Généralités

1. Le parasite

1.1. Taxonomie

L'espèce *Toxoplasma gondii* est un protozoaire à développement intracellulaire obligatoire. Il est placé dans l'embranchement des *Apicomplexa* regroupant les parasites à complexe apical, de la classe des *Coccidia*, ordre des *Eimeridea*. Il appartient à la famille des *Sarcocystidae* et son genre est *Toxoplasma* (ne comportant comme seule espèce que *Toxoplasma gondii*) (Sibley 2003).

1.2. Morphologie

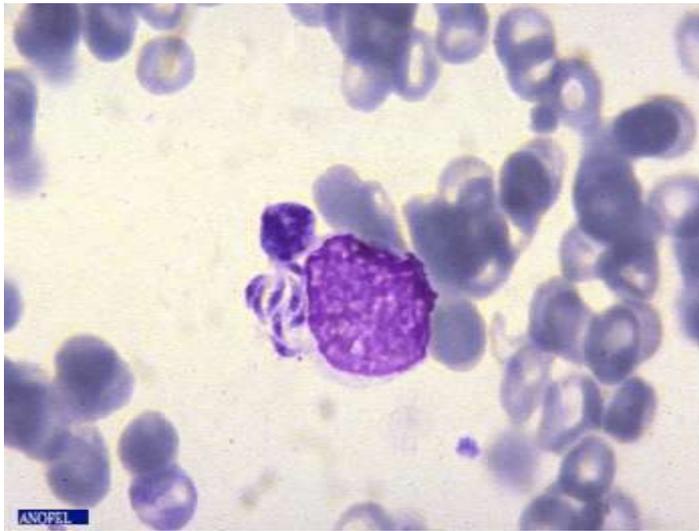
T. gondii peut se présenter sous 3 formes évolutives au cours de son cycle : tachyzoïte, kyste et oocyste.

1.2.1. Tachyzoïtes

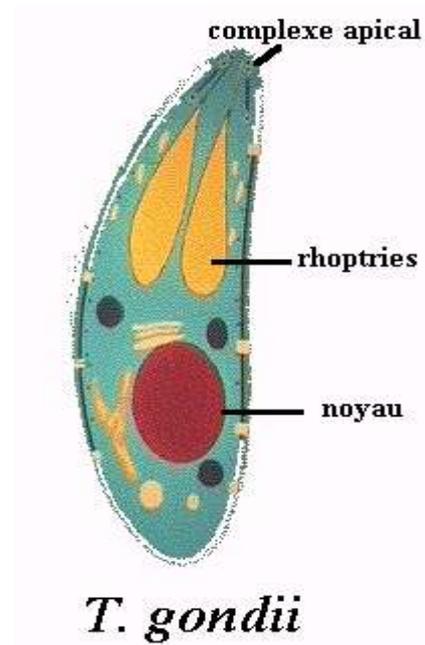
Le tachyzoïte (ou trophozoïte) est une forme de prolifération et se développe notamment dans les cellules du système réticulo-endothélial. Il a la forme d'un croissant et mesure 6 à 8 µm de long sur 3 à 4 µm de large (figure 1).

Le tachyzoïte est présent au stade aigu de l'infection, il se multiplie rapidement par endodyogénie.

Le tachyzoïte est très fragile dans le milieu extérieur. Il est détruit par l'acidité gastrique et n'est donc pas contaminant par voie orale (Pettersen 1979).



1a.



1b.

Figure 1 : 1a : Photo d'un tachyzoïte de *T.gondii* (X400) d'après Anofel. ; 1b : Schéma du tachyzoïte d'après Fortier et Ajana, 1993

1.2.2. Bradyzoïtes et kystes

Le kyste mesure de 50 à 200 μm . Il contient plusieurs centaines de bradyzoïtes (de morphologie proche du tachyzoïte) et constitue la forme de résistance et de latence du parasite dans l'organisme. Les kystes se localisent préférentiellement au niveau des muscles, du cerveau et de la rétine (Dubey 1987). Sa membrane est d'origine parasitaire et cellulaire. Elle permet de limiter considérablement l'entrée des anticorps et des médicaments.

Le kyste libère des antigènes qui entretiennent l'immunité par l'intermédiaire d'anticorps protecteurs.

Les kystes sont résistants à l'acidité gastrique (Pettersen 1979). Ils semblent toutefois sensibles à des températures élevées (destruction au delà de 67°C), à une congélation prolongée à -20°C (2 à 3 jours) et aux micro-ondes. Ils restent infectants pendant plusieurs semaines à $+4^{\circ}\text{C}$ (Dubey 1988).

Ce sont des formes de résistance et de dissémination permettant une contamination de l'homme par ingestion de viande infestée peu cuite (AFSSA 2005).



Figure 2 : Kyste à l'état frais, rompu de *T.gondii*, d'après Anofel.

1.2.3. Oocyste

L'oocyste est issu de la reproduction sexuée dans l'intestin du chat. Il est ovoïde et mesure 10 à 12 μm de diamètre. Il est émis sous forme non sporulée dans les fécès du chat, sa sporulation dans le milieu extérieur dure de 1 à 5 jours selon les conditions extérieures. A l'intérieur de l'oocyste s'individualisent deux sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes haploïdes (de structure proche du tachyzoïte) (Ferguson, Birch-Andersen et coll. 1978).

L'oocyste peut demeurer infestant plusieurs mois dans le sol. Il résiste au froid, à l'acidité gastrique mais est sensible à de fortes températures ($>60^{\circ}\text{C}$) et à la dessiccation. Une congélation, même à -20°C , est inefficace pour inactiver complètement les oocystes, ce qui rend la congélation inapplicable pour garantir la non infectiosité des végétaux. Ils sont résistants à de nombreux agents utilisés pour la désinfection, dont l'eau de Javel (Dubey, Miller et coll. 1970).



Figure 3 : Oocyste de *T.gondii*.

Les tachyzoïtes sont fragiles, peu résistants dans le milieu extérieur et donc non contaminants par voie orale.

Les kyste sont des formes de résistance et de dissémination permettant une contamination de l'homme par ingestion de viande infestée peu cuite.

1.3. Cycle

Deux cycles sont décrits, en fonction de l'hôte chez lequel *T.gondii* se développe : un cycle sexué chez l'hôte définitif, le chat, et un cycle asexué, incomplet chez les hôtes intermédiaires (oiseaux, mammifères) (Tenter, Heckerroth et coll. 2000).

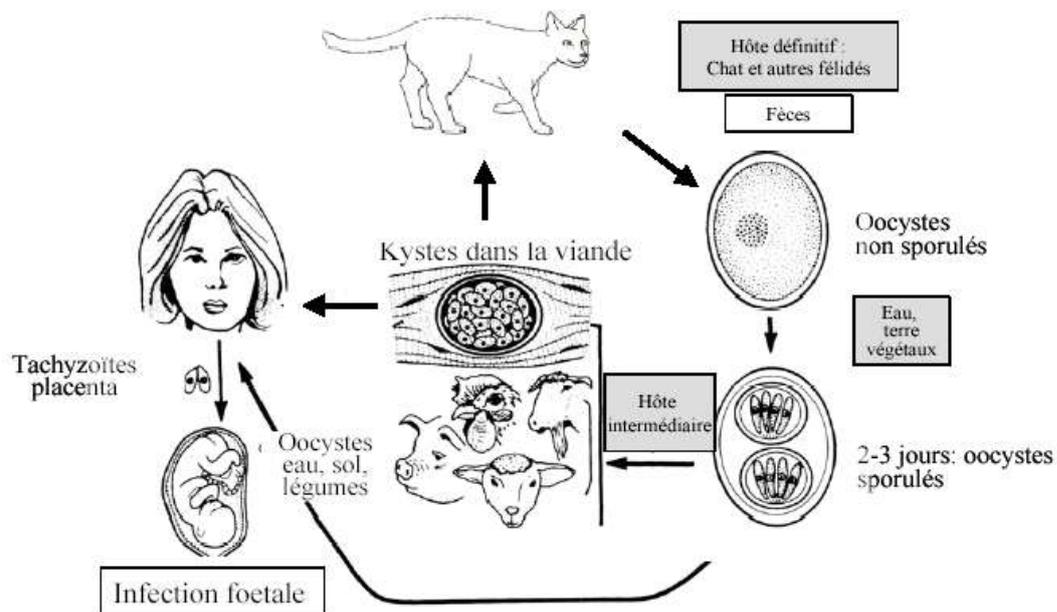


Figure 4 : Schéma du cycle de *T.gondii*, d'après Dubey et Beatty, 1988.

1.3.1. Evolution chez l'hôte définitif, le chat

Il se contamine en ingérant des rongeurs ou des oiseaux contenant des kystes (cycle hétéroxène), ou par contamination tellurique via des végétaux souillés par des oocystes (cycle monoxène).

Après leur lyse dans l'intestin de l'animal, des formes végétatives sont libérées et se multiplient par reproduction asexuée ou schizogonie. Après plusieurs cycles certains schizozoïtes ou mérozoïtes se différencient en microgamètes mâles et macrogamètes femelles. La fécondation aboutit à la formation d'un oocyste non sporulé émis dans les selles 3 à 10 jours après l'ingestion de kystes et plus de 18 jours après l'ingestion d'oocystes.

L'émission ne dure que quelques jours mais est intense (environ 1 million d'oocystes par jour).

L'oocyste non sporulé n'arrive à maturité que dans le milieu extérieur (Ferguson, Birch-Andersen et coll. 1978).

1.3.2. Evolution chez les hôtes intermédiaires

Contrairement à l'hôte définitif, il y a peu de spécificité pour l'hôte intermédiaire. Il peut s'agir d'oiseaux ou de mammifères, dont l'homme.

Après contamination, généralement par ingestion de kystes ou d'oocystes mûrs, ou plus exceptionnellement par transmission directe de tachyzoïtes (voie transplacentaire ou par le lait maternel notamment), les toxoplasmes libérés diffusent dans la circulation sanguine et sont capables d'infecter tout type de cellule nucléée. Par leur capacité d'invasion, de réplication et de lyse cellulaire, les tachyzoïtes sont responsables de l'essentiel de la pathologie de la toxoplasmose (Black, Boothroyd et coll. 2000).

Faisant suite à cette dissémination hématogène et lymphatique, les parasites s'enkystent dans les tissus, en particulier les muscles striés et le cerveau. La durée exacte de la phase sanguine reste une notion discutée, sans aucune donnée consensuelle existante. Il est admis que cette phase serait de quelques jours, fluctuant autour d'une durée de 10 jours d'après la littérature (Remington and Cavanaugh 1965; Dubey, Lindsay et coll. 1998).

Les formes parasitaires intra kystiques (bradyzoïtes) se multiplient plus lentement, sans entraîner la lyse de la cellule hôte. Ces kystes tissulaires persistent toute la vie de l'hôte. Toutefois, leur réactivation est possible, conduisant à la libération des bradyzoïtes et à la reprise évolutive d'une multiplication parasitaire sous forme de tachyzoïtes. Le mécanisme de l'interconversion entre bradyzoïtes et tachyzoïtes semble très complexe et est encore mal connu.

L'infection toxoplasmique génère une réponse humorale et cellulaire intense permettant le contrôle de la phase initiale de dissémination parasitaire ou des réactivations kystiques, et le maintien d'une immunité protégeant de la réinfection. Cette immunité protectrice ne semble pas totale puisque des cas d'infections mixtes par des souches de génotype différent semblent possibles et des réinfections expérimentales ont été décrites avec des souches différentes de la souche infectante initiale (Aspinall 2003 ; Dao, Fortier et coll. 2001).

***Toxoplasma gondii* présente une spécificité étroite pour le chat, qui constitue un réservoir important et contribue à la propagation du parasite. La spécificité pour les hôtes intermédiaires (oiseaux, mammifères) est très faible.**

2. Toxoplasmose humaine

2.1. Epidémiologie

La séroprévalence de la toxoplasmose, parasitose cosmopolite, est variable selon les zones géographiques. La prévalence, estimée élevée dans les pays chauds et humides avec une grande concentration de félins, se trouve faible voire nulle dans les pays froids.

En effet, la prévalence est d'autant plus faible que le niveau socio-économique augmente et que le climat devient rigoureux.

Elle est élevée en Europe (et particulièrement en France) aux alentours de 58%, en Amérique du Sud (51 à 72% selon les pays) et dans certains pays d'Afrique (54 à 77%). Elle est faible dans les pays anglo-saxons (15% aux Etats-Unis) et en Asie (4 à 39 %) (Rorman, Zamir et coll. 2006).

En France, depuis la mise en place du dépistage systématique de la toxoplasmose dans le cadre du certificat prénuptial (1978), puis des examens prénataux (1985), de nombreuses études de séroprévalence ont été publiées.

L'enquête Nationale Périnatale de 1995 rapportait une séroprévalence globale de 54,3% (Barbier, Ancelle et coll. 1983).

Elle est fonction :

- **de l'âge** (43% chez les jeunes femmes de 14 à 19 ans, contre 66% chez les femmes de plus de 39 ans).
- **des régions** (prévalence de 43 à 68%, avec une valeur médiane régionale à 53%).
- **de la nationalité**, avec une séroprévalence supérieure chez les femmes françaises par rapport aux autres nationalités (autres pays européens, Afrique du nord, Afrique subsaharienne).
- **de la catégorie socio-professionnelle**.

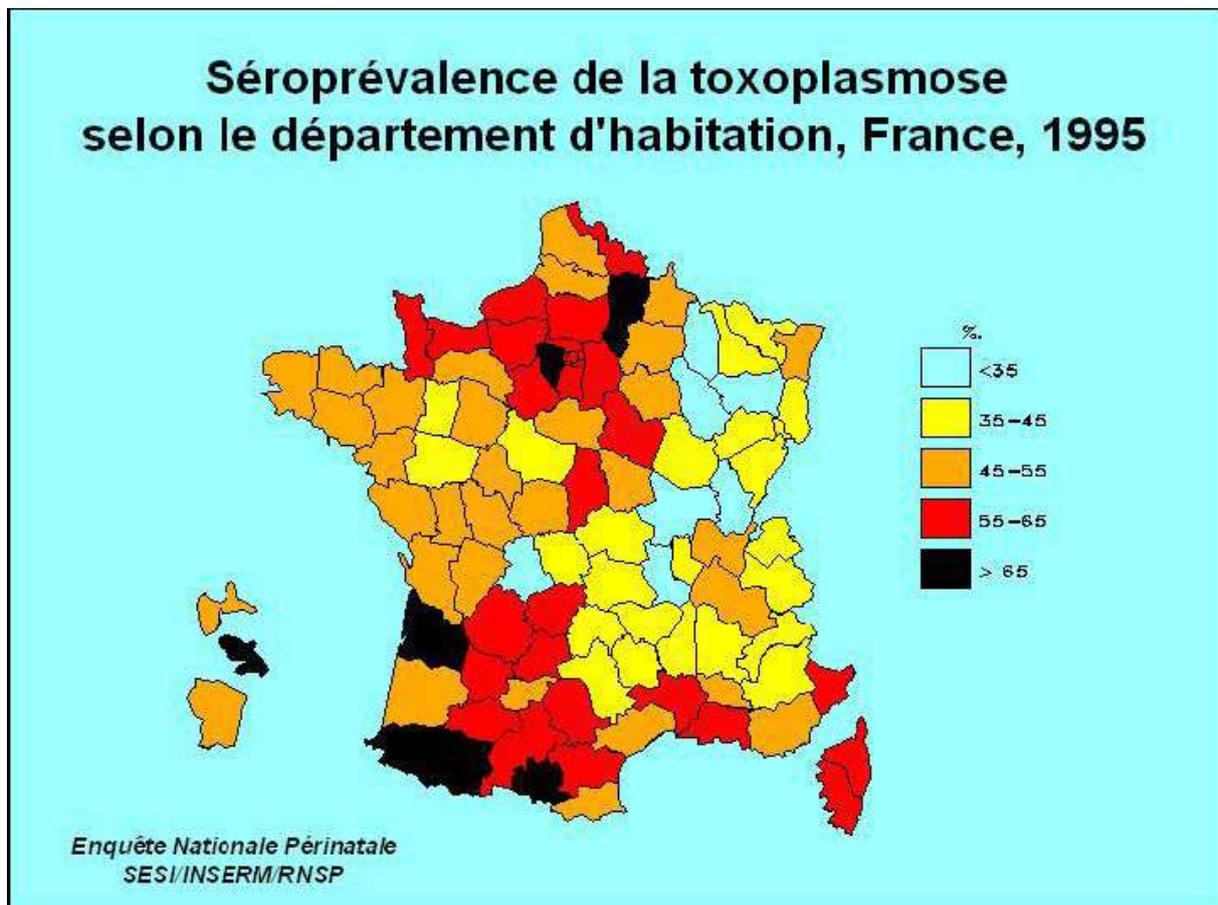


Figure 5 : Séroprévalence de la toxoplasmose selon le département d'habitation (1995).

La toxoplasmose est une parasitose cosmopolite, de prévalence variable selon les zones géographiques.

2.2. Modes de contamination de l'homme

❖ À partir de kystes :

L'homme peut se contaminer par ingestion de viande crue ou insuffisamment cuite contenant les kystes. La contamination est surtout liée à la consommation de porc, mouton et bœuf.

Les kystes sont très résistants : ils résistent à l'acidité gastrique, restent viables après deux mois à 4°C. Néanmoins, ils sont détruits par la chaleur et par la congélation à -20°C pendant 18 à 24 heures. La consommation de viande préalablement congelée, de plus en plus fréquente, aurait pour conséquence une diminution de la séroprévalence chez les femmes en âge de procréer (Dubey 1988; Anonyme 1996).

La particularité des toxoplasmoses transmises par transplantation d'organes vient du fait qu'il s'agit le plus souvent d'une réactivation de kystes contenus dans le greffon. Les conséquences sont à la fois locales (rejet) puis générales, par dissémination parasitaire (Giordano, Lasmar et coll. 2002).

❖ À partir d'oocystes :

La contamination se fait par l'intermédiaire des aliments (crudités, fruits) ou des boissons souillés par les oocystes sporulés provenant des déjections de chats. Le risque de contamination augmente avec la présence d'un chat dans le foyer mais surtout avec la manipulation de sa litière dans laquelle des oocystes ont pu sporuler. Il est à noter le caractère extrêmement transitoire de l'excrétion d'oocystes par le chat. De plus, compte tenu de l'immunité acquise à la suite d'une première infection, ce sont avant tout les jeunes chatons qui sont excréteurs d'oocystes, mais des ré-excrétions sont toujours possibles, à tout âge (Fernandez, Ouvina et coll. 1995).

La contamination peut également se faire par l'intermédiaire des mains sales ou d'ustensiles de cuisine suite à la manipulation de viande ou de végétaux souillés (AFSSA 2005).

❖ À partir de tachyzoïtes :

Ce sont les tachyzoïtes qui sont responsables de la contamination du fœtus, *via* le placenta. Après contamination de la mère, il s'ensuit une diffusion hématogène du parasite, qui peut contaminer le fœtus après colonisation placentaire par les tachyzoïtes. Ce mode particulier de contamination conduit à une dissémination parasitaire chez le fœtus et à une atteinte multiviscérale possible (cerveau, œil, foie, poumon...) (Roberts and McLeod 1999).

Expérimentalement, l'infection placentaire se caractérise par une invasion du trophoblaste et une induction d'apoptose des cellules non infectées principalement, les cellules infectées étant plutôt protégées de l'apoptose. Cependant, le mécanisme et la cinétique de la transmission materno-fœtale restent encore mal connus (Abbasi, Kowalewska-Grochowska et coll. 2003). Le placenta semble retarder la transmission parasitaire de la mère au fœtus, ce que confirme le fait qu'un délai de plusieurs semaines après la séroconversion maternelle est nécessaire pour mettre en évidence le parasite dans le liquide amniotique, lors du diagnostic prénatal (Ferro, Silva et coll. 2002).

Les tachyzoïtes sont également responsables de rares cas de contaminations lors de transfusions sanguines ou de greffes de moelle. Ces contaminations restent exceptionnelles, du fait de la brièveté de la parasitémie chez un sujet récemment infecté (Nelson, Kauffmann et coll. 1989).

La consommation de viande crue ou insuffisamment cuite représente le principal mode de contamination de l'homme.

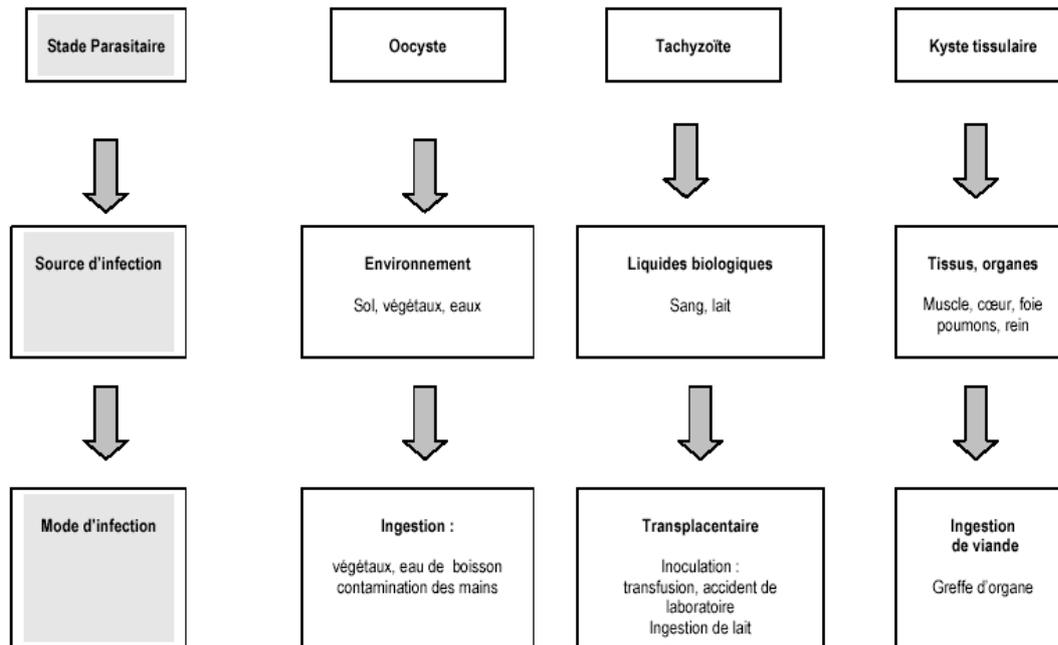


Figure 6 : Sources et modes de contamination humaine (Evans 1992)

2.3. Clinique

2.3.1. Toxoplasmose de l'immunocompétent

Elle est en règle infra clinique pour plus de 80% des cas, décelée au décours d'examens sérologiques systématiques.

Lorsqu'elle est symptomatique, elle réalise le plus souvent un tableau de lymphadénopathie. Dans 90% des formes à expression clinique, on retrouve des adénopathies cervicales, voire axillaires, inguinales, mésentériques, médiastinales... Ces ganglions de taille moyenne, indolores, mobiles, peuvent persister jusqu'à quelques mois.

Hormis les adénopathies, on retrouve dans 40% des cas une asthénie parfois intense et durable, et une brève fébricule (Pelloux, Fricker-Hidalgo et coll. 2002).

D'autres signes sont plus rares : exanthème maculo-papuleux, myalgies, céphalées, signes neurologiques et arthralgies.

Sur le frottis sanguin, on observe un syndrome mononucléosique avec présence de lymphocytes hyperbasophiles.

L'évolution clinique est favorable et spontanément résolutive dans la majorité des cas.

2.3.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé

La maladie peut être **gravissime** avec atteinte pluriviscérale, pulmonaire, rénale, musculaire mais surtout encéphalique. Elle est le plus souvent due à une réactivation d'une infection chronique (95% des cas) plutôt qu'à une primo-infection, mais quelques cas de dissémination hémotogène faisant directement suite à l'infection ont été évoqués lors de toxoplasmoses cérébrales ou pulmonaires (Raffi, Tiab et coll. 1992).

C'est une infection opportuniste majeure au cours du SIDA (en 2^{ème} place derrière la pneumocystose).

On décrit différentes formes cliniques :

- toxoplasmose cérébrale ou encéphalite toxoplasmique comportant des abcès cérébraux et des signes neurologiques focaux dans un contexte fébrile avec troubles de la conscience, voire troubles psychiatriques (Raffi, Aboulker et coll. 1997). C'est de loin l'atteinte la plus fréquente,

- rétinite toxoplasmique (2^{ème} localisation viscérale en fréquence) : dans 10 à 20 % des cas, elle est associée à la toxoplasmose cérébrale,

- toxoplasmose pulmonaire (2 à 3%) à type de pneumopathie interstitielle diffuse fébrile (diagnostic par mise en évidence de trophozoïtes dans le LBA le plus souvent par PCR) : peu fréquente mais très grave,

- toxoplasmose disséminée, lors de déficits immunitaires très profonds.

La toxoplasmose est également un risque non négligeable dans diverses situations d'immunodépression touchant l'immunité cellulaire (greffés sous immunosuppresseurs, maladie de Hodgkin...).

2.3.3. Toxoplasmose congénitale

L'infection d'une femme enceinte non immunisée expose au risque de transmission materno-fœtale avec possibilité d'atteinte congénitale grave.

Nous développerons ce point de façon plus approfondie dans le chapitre suivant.

La toxoplasmose est une affection bénigne dans sa forme classique du sujet immunocompétent.

A l'inverse, elle peut être redoutable chez le sujet immunodéprimé ou lorsqu'elle atteint le fœtus en cas de séroconversion chez la femme enceinte.

II. Toxoplasmose congénitale

1. Epidémiologie

La toxoplasmose congénitale reste aujourd'hui un problème de santé publique en France, qui impose la poursuite du programme national de prévention.

La séroprévalence chez les femmes enceintes avoisine 54 %, soit un taux parmi les plus élevés d'Europe, avec un risque d'infection pendant la grossesse évalué à 1,5 %.

On estime le taux de séroconversions entre 0,4 et 1,6 %. Cela représente 5000 à 6000 séroconversions par an chez les femmes enceintes.

Suite à une infection en cours de grossesse, environ un tiers des fœtus est infecté. Ainsi, 1 à 3 cas pour 1000 naissances sont dénombrés, soit 700 à 2100 cas par an en France. Une forme grave de toxoplasmose congénitale surviendrait chez 150 d'entre eux (Thiebaugeorges and Schweitzer 2003).

En France, près d'une femme sur deux en âge de procréer n'est pas immunisée contre le toxoplasme ; entre 0,4 et 1,6 % d'entre elles feront une séroconversion pendant leur grossesse.

2. Législation en Europe et en France

En 2000, la Commission Européenne a mis en place un réseau de surveillance spécialisé concernant les maladies transmissibles de l'animal à l'homme.

Toutefois, à ce jour, concernant le dépistage de la toxoplasmose humaine dans les états membres, il n'existe pas de législation, sauf en France, qui est l'un des pays européens où le dépistage de la toxoplasmose chez les femmes enceintes est le plus strict.

Pour nos voisins européens, des recommandations sont préconisées :

- Allemagne (Janitschke 2003) :

Il existe un programme national de prévention qui encourage les femmes enceintes à faire un sérologiediagnostic en cas de suspicion clinique de toxoplasmose.

Depuis 1996, des lignes directrices officielles recommandent le diagnostic de la toxoplasmose lors d'un traitement contre la stérilité, avant la conception, pendant la grossesse et après la naissance.

- Autriche (Aspöck 2003) :

Des mesures financières incitatives depuis 1975 encouragent les femmes à effectuer des examens de dépistage durant la grossesse. Celles qui ont été correctement suivies touchent une allocation.

- Belgique (Naessens 2003) :

La forte incidence de la toxoplasmose congénitale a conduit les autorités belges à mener une réflexion stratégique sur la prévention chez la femme enceinte.

Il a été décidé de pratiquer un dépistage dès la première consultation.

En cas de sérologienégitivité, la femme enceinte fait une sérologie trimestrielle pour dépister une éventuelle séroconversion.

Des recommandations portant sur la consommation et la cuisson de certains aliments sont fournies.

- Italie (Buffolano 2003) :

Depuis 1994, sous la pression des praticiens faisant l'objet de contentieux liés à des toxoplasmoses non diagnostiquées, 2 examens sont désormais pris en charge et remboursés par l'assurance maladie. Ces sérologies doivent avoir lieu à 20 et 36 semaines d'aménorrhée chez les femmes à risque. Depuis 1998, les femmes séronégatives bénéficient d'une sérologie mensuelle et d'un diagnostic anténatal en cas de séroconversion.

Il manque encore une harmonisation au niveau national, tant dans les méthodes d'analyse que dans le recensement des cas (maladie à déclaration non obligatoire).

• Finlande (Lappalainen 2003) :

Il n'y a pas de dépistage systématique pendant la grossesse mais un dépistage ciblé.

D'autre part, une information sur la prévention primaire est délivrée aux futures mères.

• Royaume-Uni (Pinon, Dumon et coll. 2001) :

Depuis 1998, il existe un centre national de référence qui centralise les données. Chaque femme enceinte reçoit un livret d'information édité par les autorités ou par des associations caritatives précisant des risques liés à la toxoplasmose.

Il n'y a pas de surveillance obligatoire ni de dépistage de la toxoplasmose, pendant ou après la grossesse ; ces tests sérologiques ne sont réalisés qu'à la demande de la patiente.

En France, les textes législatifs prévoient un dépistage sérologique systématique lors de *l'examen prénuptial* des femmes âgées de moins de 50 ans (décret du 17 mars 1978).

Cette mesure est étendue au cours de *l'examen prénatal*, avant la 15^{ème} semaine de grossesse, chez toute femme de statut sérologique inconnu, ou négatif (arrêté du 18 avril 1985). Mais il serait recommandé de pratiquer une sérologie le plus tôt possible au cours de la grossesse, voire dès l'arrêt de la contraception, pour limiter les difficultés d'interprétation en début de grossesse (Thiebaugeorges et Schweitzer 2003).

La législation française impose également un *suivi sérologique mensuel jusqu'à l'accouchement chez la femme enceinte non immunisée, dans le but de diagnostiquer un tout début d'infection et de traiter précocement* (décret du 14 février 1992).

Il est, de plus, souhaitable de pratiquer une sérologie dans le mois suivant l'accouchement pour détecter une éventuelle séroconversion survenue dans les derniers jours de la grossesse (Pelloux, Fricker-Hidalgo et coll. 2002). Mais cette démarche est juste « très recommandée », mais non obligatoire et de plus, non prise en charge par la Sécurité Sociale.

Le biologiste est tenu de quantifier les IgG en UI/mL et de détecter les IgM, en indiquant les méthodes utilisées. Le sérum doit être congelé et conservé 1 an. Une conclusion doit être apportée au médecin prescripteur sur la présence ou l'absence d'anticorps antitoxoplasmiques,

et sur l'ancienneté de l'infection en cas de positivité. Il doit proposer les modalités du suivi sérologique éventuel, et utiliser des techniques complémentaires si nécessaire.

Une immunité ancienne confirmée sur 2 prélèvements élimine tout risque de contamination fœtale et donc toute surveillance ultérieure.

<p>En France, la législation impose le suivi mensuel de toutes les femmes séronégatives jusqu'à leur accouchement. Le biologiste doit apporter sa conclusion à chaque analyse et conserver les sérums 1 an.</p>
--

3. Physiopathologie

3.1. Transmission materno-fœtale

(Thiebaut, Leproust et coll. 2007)

L'infection du fœtus est la conséquence de plusieurs événements : la primo-infection maternelle au cours de la grossesse avec une phase de parasitémie maternelle (précoce, transitoire, d'environ 10 à 15 jours) et le passage de tachyzoïtes dans le placenta puis vers la circulation fœtale.

Le caractère transitoire de la parasitémie explique la rareté des toxoplasmoses congénitales consécutives à une infection pré-conceptionnelle de la mère.

Néanmoins de rares cas de transmission fœtale ont été décrits, suite à une infection maternelle quelques mois avant la grossesse, chez des femmes immunocompétentes ! Chemla rapporte en effet le cas d'une contamination fœtale suite à la séroconversion maternelle dans les quelques jours précédant la conception, mais il s'agissait séroconversion **symptomatique** avec présence d'adénopathies cervicales chez la mère.

De même, Desmonts décrit un cas d'atteinte fœtale suite à une séroconversion maternelle **symptomatique** ayant eu lieu 2 mois avant la conception, et enfin, Villena plus récemment fait état du même phénomène avec adénopathies chez la mère. Cet auteur va jusqu'à recommander de laisser un délai de prudence de 6 à 9 mois entre séroconversion et conception d'un bébé (Desmonts, Couvreur et coll. 1990; Marty, Le Fichoux et coll. 1991; Villena, Chemla et coll. 1998; Chemla, Villena et coll. 2002).

Mais ces situations s'observent le plus souvent chez des femmes immunodéprimées, par le VIH, la maladie de Hodgkin ou un traitement par corticothérapie lors de maladies auto-immunes sévères. On peut penser que de tels cas sont la conséquence de parasitémie récurrente ou de la réactivation de kystes intra-tissulaires (Desmonts, Couvreur et coll. 1990 ; Montoya, Giraldo et coll. 2001).

Enfin, il est possible qu'une réinfection maternelle par ingestion d'oocystes en cours de grossesse puisse exceptionnellement être à l'origine d'une transmission verticale de l'infection (Robert-Gangneux, Gavinet et coll. 1999).

Deux recommandations sont préconisées à la suite de telles observations (Couvreur 1999), (Romand, 1998) :

- *Respecter un délai de 3 à 6 mois avant toute grossesse en cas de séroconversion récente, voire jusqu'à 6 à 9 mois selon certains auteurs (Villena, Chemla et coll. 1998).*
- *Assurer une surveillance échographique accrue chez les femmes ayant fait une séroconversion périconceptionnelle.*

La contamination materno-fœtale est déterminée par le passage transplacentaire du parasite. La placentopathie précède toujours la foetopathie. Le placenta reste une barrière au franchissement des tachyzoïtes et l'infection du fœtus n'est pas obligatoire en cas d'infection de la mère, ni obligatoire en cas de placentite.

Le placenta retarde l'invasion fœtale par le parasite : cela correspond à la notion de « délai placentaire », qui est fonction de la vascularisation du placenta augmentant au cours de la grossesse. Il est long en début de grossesse et est de plus en plus court lorsque l'on avance dans la grossesse.

De ce fait, dans le cas d'une infection maternelle proche de la conception, la transmission au fœtus est faible, < 2% (Couvreur 1984 ; Chemla, Villena et coll. 2002).

La gravité de l'atteinte est le plus souvent très importante (avortement spontané, mort fœtale *in utero*) : l'embryon à ce terme n'est pas encore capable de synthétiser des anticorps protecteurs (pas avant la 10^{ème} semaine d'aménorrhée) et les anticorps maternels (IgG) n'ont pas eu le temps d'être transmises au fœtus. La gravité de l'atteinte tient à ce qu'elle se produit chez un organisme en phase de développement embryonnaire.

Pour une infection acquise en cours de grossesse, la fréquence de transmission augmente avec l'âge gestationnel :

- 5 à 15% au cours du 1^{er} trimestre, 30 à 40% lors du 2^{ème}, et de 45 à 80% pour les infections du 3^{ème} trimestre (Pelloux, Fricker-Hidalgo et coll. 2002).

- 6 % à 13 semaines, 40 % à 26 semaines et 72 % à 36 semaines (Dunn, 1999).

A l'approche du terme, le placenta est plus volumineux et très vascularisé. Il est facilement colonisé par les parasites et n'est alors qu'une barrière facile à traverser. A ce stade, la contamination fœtale est en général contemporaine de la contamination maternelle mais l'atteinte du fœtus est moindre et le plus souvent infra clinique. En effet son système immunitaire est en place et sera secondairement renforcé par l'immunité passive de la mère : les IgG transmises sont des anticorps protecteurs, lytiques pour le parasite extracellulaire, limitant ainsi sa dissémination. En revanche, ils n'agissent pas sur les formes intracellulaires. L'infection est alors ralentie, atténuée, mais elle sera prolongée et laissera l'enfant porteur d'un grand nombre de kystes (Desmots 1984).

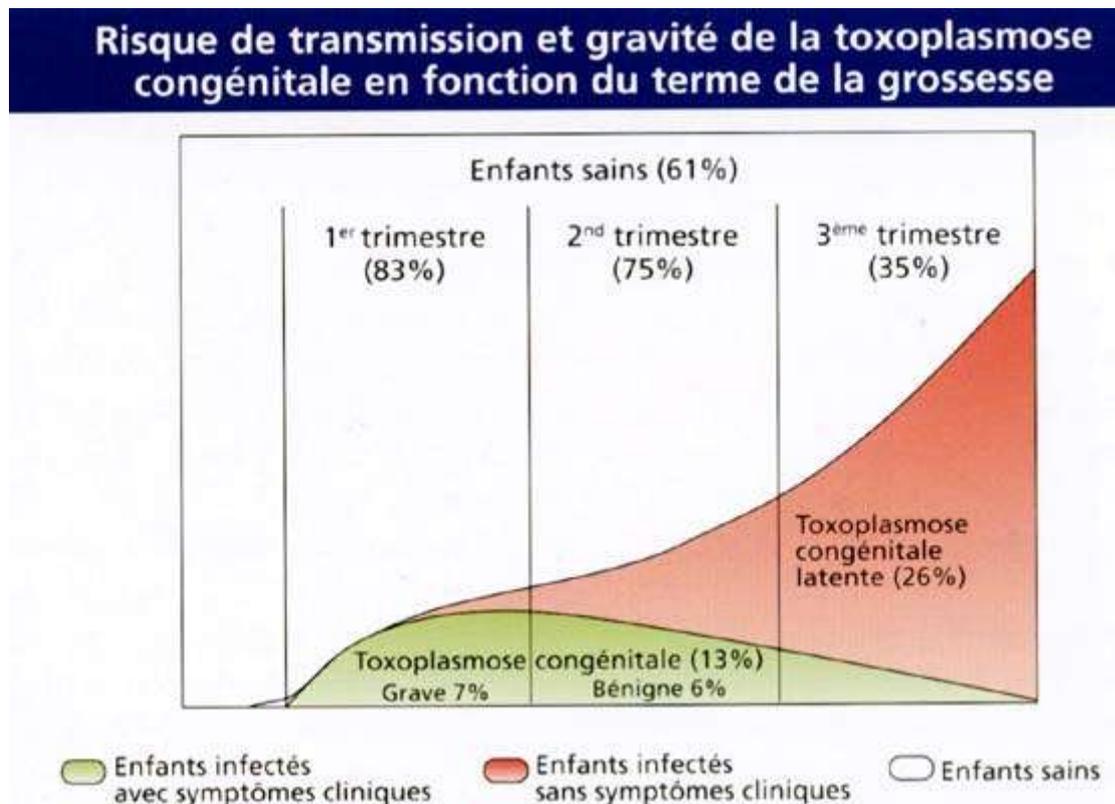


Figure 7 : Risque de transmission et gravité de la toxoplasmose congénitale en fonction du terme, d'après Anofel.

La contamination materno-fœtale est déterminée par le passage transplacentaire du parasite qui dépend essentiellement de la vascularisation du placenta. La transmission est d'autant plus importante que le placenta est vascularisé et augmente plus la grossesse avance pour être quasi systématique pour des séroconversions proches du terme.

3.2. Atteinte fœtale

La fréquence et la gravité de l'atteinte fœtale dépendent de différents facteurs : la date de la contamination maternelle; le stade de développement placentaire ; l'état immunitaire du fœtus ; le passage transplacentaire d'anticorps maternels ; l'importance de la parasitémie maternelle et la capacité de réponse humorale et cellulaire de la mère ; le type et la précocité du traitement mis en œuvre et la virulence de la souche de toxoplasme.

❖ La date de la contamination maternelle :

L'atteinte fœtale est d'autant plus grave que la contamination maternelle est précoce (Dunn, Wallon et coll. 1999).

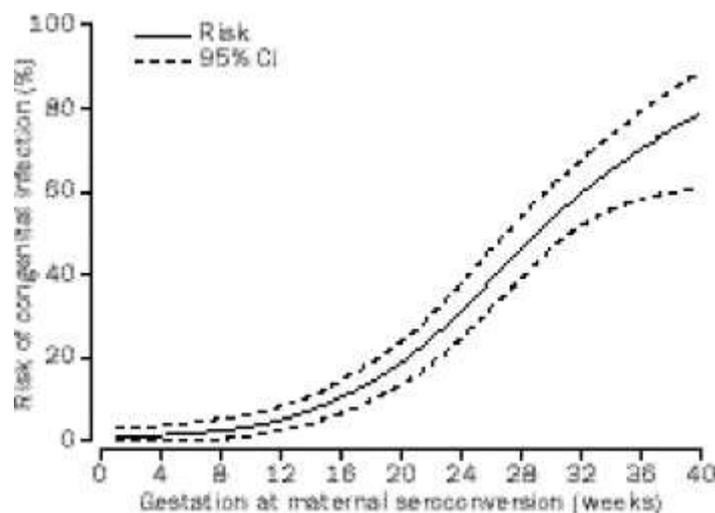


Figure 8 : Risque d'infection congénitale en fonction de l'âge gestationnel lors de la séroconversion (Dunn, Wallon et coll. 1999).

Nous avons vu préalablement que le risque pour le bébé est très faible en cas de contamination maternelle anteconceptionnelle, sauf en cas de déficit immunitaire ou de séroconversion maternelle **symptomatique**.

En période périconceptionnelle, le risque de transmission est faible mais associé à un risque maximal en cas d'atteinte fœtale. Ses conséquences sont variables : mort *in utero* fréquemment, ou handicap majeur (hydrocéphalie, calcifications cérébrales, chorioretinite). Wallon affirme dans son étude de 2002 que les séroconversions des 8 premières semaines de grossesse entraînent seulement 2% d'atteinte fœtale, mais qui se traduisent par des atteintes importantes avec anomalies échographiques. Cet auteur ne recommande l'interruption médicale de grossesse que dans ce cas où des atteintes échographiques seraient notées. Dans le cas contraire, plus de 90% des enfants naîtraient indemnes de toute infection. Pour les 8% restant, il n'a pas été possible de conclure.

Si la grossesse est menée à terme sans anomalie (car il y a encore un risque important de perte fœtale spontanée), les séquelles chez les enfants contaminés semblent peu importantes dans cette étude. Il est préconisé un traitement par Spiramycine (Rovamycine®), une surveillance échographique mensuelle, une amniocentèse à partir de la 16^{ème} SPC et renforcement par pyriméthamine et sulfamides en cas de PCR positive (Wallon, Gaucherand et coll. 2002).

En avançant dans la grossesse, le risque de passage au fœtus augmente, tandis qu'en parallèle diminue le risque de conséquences cliniques pour le bébé (Dunn, Wallon et coll. 1999).

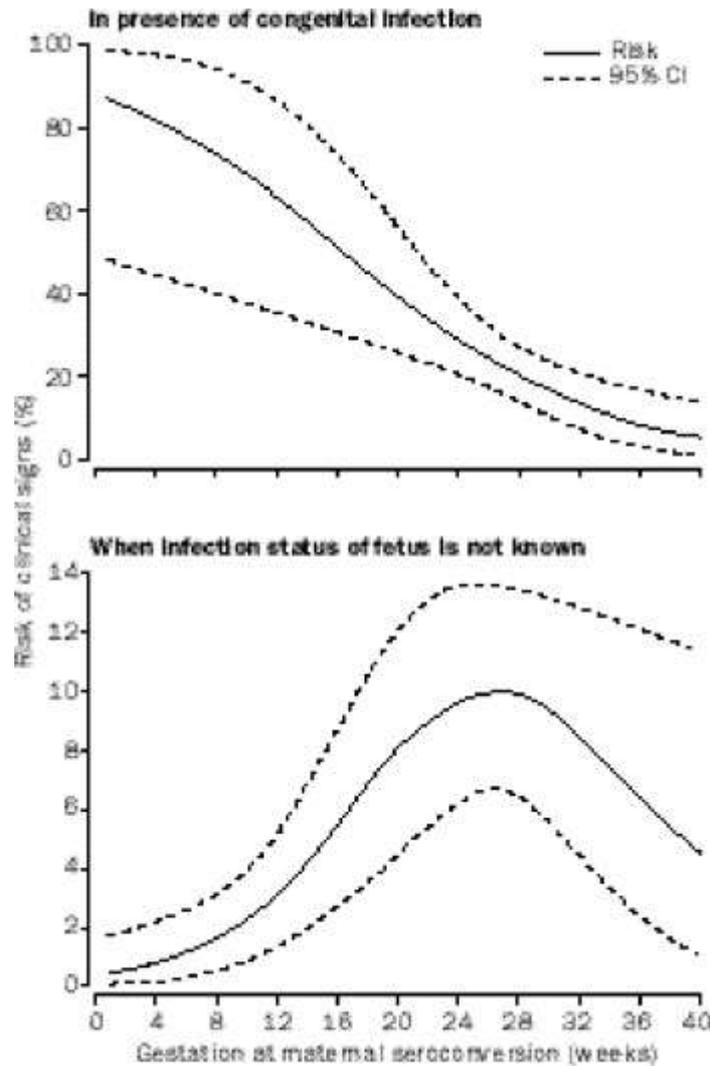


Figure 9 : Risque de développer des signes cliniques avant l'âge de 3 ans selon l'âge gestationnel (SA) lors de l'infection fœtale (Dunn, Wallon et coll. 1999).

↳ La période de contamination maternelle la plus critique semble donc se situer entre la 10^{ème} et la 24^{ème} SA (Dunn, Wallon et coll. 1999).

Pour Dunn en 1999, la période de 24 à 30 SA (avec un pic à 28 SA) semble ensuite être la plus à risque pour le fœtus d'être infecté et de développer des signes cliniques précoces après sa naissance et des complications oculaires à plus ou moins long terme.

Tableau 1 : synthèse de 2 études montrant atteintes maternelle et fœtale en fonction de l'âge gestationnel au moment de la contamination.

	Pratlong et coll. (1994)			Hohfeld et coll. (1994)		
	7-15	16-28	>28	3-14	15-26	27-34
Gestation (semaines)	7-15	16-28	>28	3-14	15-26	27-34
Infection maternelle	102	70	15	1398	745	38
Infection congénitale	4	12	8	52	123	11
Taux de transmission (%)	3,8	17,1	53,1	3,7	16,5	28,9

- ❖ **Le stade de développement placentaire** (structure, vascularisation...), ce qui est corrélé avec l'âge de la grossesse.
- ❖ **L'état immunitaire du fœtus** et son aptitude à synthétiser des anticorps (possible à partir de la 10^{ème} SA).
- ❖ **Le passage transplacentaire d'anticorps maternels** (IgG), limitant la dissémination toxoplasmique.
- ❖ **L'importance de la parasitémie maternelle et la capacité de réponse humorale et cellulaire de la mère.**
- ❖ **La précocité du traitement mis en œuvre.**

Les conclusions des études sont assez contradictoires (Wallon, Liou et coll. 1999).

D'autres essais cliniques seraient nécessaires pour conclure, en se basant sur des cohortes plus importantes (SYROCOT 2007).

Quelques études rapportent une diminution du taux de transmission de la toxoplasmose au fœtus suite au traitement maternel (Roux, Desmonts et coll. 1975; Douche, Benabdesselam et coll. 1996).

La plupart des auteurs soulignent le manque d'efficacité du traitement sur le taux de transmission (Wallon, Liou et coll. 1999; Gilbert, Dunn et coll. 2001; Gilbert, Gras et coll. 2001; SYROCOT 2007).

Pour ce qui est de l'influence de la précocité de mise en œuvre du traitement sur la transmission, là encore les données sont contradictoires.

Quelques études rapportent une efficacité lorsque le traitement est mis en place le plus tôt possible après la séroconversion (Foulon, Villena et coll. 1999). Néanmoins, la majorité des auteurs souligne l'absence d'efficacité du traitement, même démarré précocement, sur le risque de transmission au fœtus (Gilbert, Gras et coll. 2001; SYROCOT 2007).

Enfin, concernant l'efficacité du traitement prénatal sur les conséquences cliniques sur le fœtus, les études montrent aussi des conclusions dissemblables.

Certaines n'attribuent aucun impact au traitement sur le type d'atteinte fœtale (Gras, Gilbert et coll. 2001).

D'autres au contraire montrent qu'il y aurait un possible bénéfice clinique du traitement, démarré le plus précocement possible (dans les 4 semaines suivant la séroconversion) (Gilbert, Gras et coll. 2001; Gras, Wallon et coll. 2005).

❖ **La virulence de la souche de toxoplasme** : il existe un faible polymorphisme au sein de l'espèce *T. gondii* : 3 groupes majeurs, avec une prédominance du type II en Europe (responsable de la majorité des réactivations toxoplasmiques au cours du SIDA et le plus fréquemment retrouvé dans les toxoplasmoses congénitales, qu'elles soient latentes ou mortelles) (Darde 1996; Peyron, Lobry et coll. 2006).

Ci-dessous est rapporté le résumé des caractéristiques des principaux génotypes de *T. gondii*, d'après le rapport de l'AFSSA de 2005 : « Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation ; rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'AFSSA :

- **Type I:**
 - rarement isolé (≅ 10% des souches).

- multiplication rapide des tachyzoïtes *in vitro* (environ 3 fois plus rapide que celle des souches de type II ou III, peu de transformation en bradyzoïtes et de formation de kystes.
- capacités de migration et de transmigration à travers des barrières biologiques *ex vivo* supérieures à celles des types II et III.
- excès de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ) chez la souris.
- *toxoplasmoses humaines* : atteintes congénitales plus souvent sévères, possibilité d'isolement à partir de toxoplasmoses de réactivation au cours des états d'immunodéficience.

- **Type II :**

- le plus fréquent (homme, animaux domestiques) (\cong 80% des souches humaines en France).
- non-virulent pour la souris .
- formation plus facile de bradyzoïtes et kystes *in vitro*.
- capacités de migration et de transmigration à travers des barrières biologiques *ex vivo* inférieures à celles du type I.
- sécrétion contrôlée et protectrice d'IFN γ chez la souris.
- *toxoplasmoses humaines* : atteintes congénitales plus ou moins sévères, réactivations au cours des états d'immunodéficience, formes lymphadénopathiques classiques du patient immunocompétent, toxoplasmoses asymptomatiques.

- **Type III :**

- rare dans la population de toxoplasmes étudiée.
- virulence intermédiaire pour la souris.
- *toxoplasmoses humaines* : atteintes congénitales (faible nombre de cas).

En avançant dans la grossesse, le risque de passage au fœtus augmente, tandis qu'en parallèle diminue le risque de conséquences cliniques pour le bébé. La période de contamination maternelle la plus critique semble donc se situer entre la 10^{ème} et la 24^{ème} SA.

4. Clinique

La toxoplasmose congénitale peut se présenter sous 4 tableaux cliniques différents par ordre de gravité décroissante (Couvreur, Desmonts et coll. 1984) :

➤ La **toxoplasmose viscérale ou forme généralisée** : c'est la forme historique, qui reste rarissime. Il est observé un tableau d'hépatosplénomégalie avec ictère néonatal, hémorragies, atteintes digestive (Couvreur, Desmonts et coll. 1984)...

➤ **Atteinte neurologique : l'encéphalomyélite** : (figure 10)

Elle survient suite à une contamination précoce au cours de la grossesse. Cette forme est rare mais de pronostic péjoratif. Elle peut entraîner la mort *in utero* ou dans les mois qui suivent la naissance. En cas de survie, l'enfant souffre de graves retards psychomoteurs, de crises convulsives, troubles oculaires...



[Photo : toxoplasmose : Toxoplasmose cérébrale](#)
(Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital St Louis, Paris)

Figure 10 : Imagerie de toxoplasmose cérébrale.

➤ La **toxoplasmose congénitale bénigne** :

Ce sont des formes assez fréquentes (20 à 30%). La lésion oculaire caractéristique est la chorioretinite pigmentaire. La gravité de cette pathologie est variable, selon la localisation de la lésion et son étendue (figure 11).

Binquet rapporte que le risque pour l'enfant de développer une atteinte oculaire augmente en cas de contamination maternelle précoce mais aussi en cas de séroconversion ante ou périconceptionnelle et en cas de naissance prématurée de l'enfant (Binquet, Wallon et coll. 2003).

Il peut également être observé des calcifications intracrâniennes, mises en évidence par radiographie du crâne et l'échographie transfontanellaire à la naissance, qui imposent un traitement immédiat.

➤ La **toxoplasmose congénitale infra clinique** :

Ce sont les *formes les plus fréquentes* (70 à 80%). L'enfant est cliniquement indemne à la naissance. La certitude de l'infection est apportée par le diagnostic biologique néonatal.

Ces formes sont importantes à déceler, car même les enfants apparemment sains peuvent développer ultérieurement une chorioretinite. Ce risque est supérieur à 50% en l'absence de traitement, et inférieur à 10% si l'enfant est traité pendant les premiers mois de sa vie (Couvreur 1999; Brezin, Thulliez et coll. 2003).

Une recrudescence de ces formes est notée en période pubertaire. Notons que dans cette étude, sur 327 enfants atteints de toxoplasmose congénitale, 24 % ont développé des atteintes oculaires plus ou moins précocement, sur 1 seul œil pour les $\frac{3}{4}$, avec un nombre de lésions variable. En tout, 29% des enfants ont eu des séquelles, oculaires pour la plupart (Wallon, Kodjikian et coll. 2004).

Tableau 2 : manifestations cliniques de la toxoplasmose congénitale pour 327 enfants suivis pendant une quinzaine d'années (Wallon, Kodjikian et coll. 2004).

Manifestations cliniques	Nombre d'enfants	%
Atteinte de plusieurs organes	95	29
Atteinte oculaire	60	18
Atteinte du système nerveux central	35	11
Calcifications cérébrales	31	9
Hydrocéphalie	6	2
Microcéphalie	1	<1
Aucune atteinte	232	71

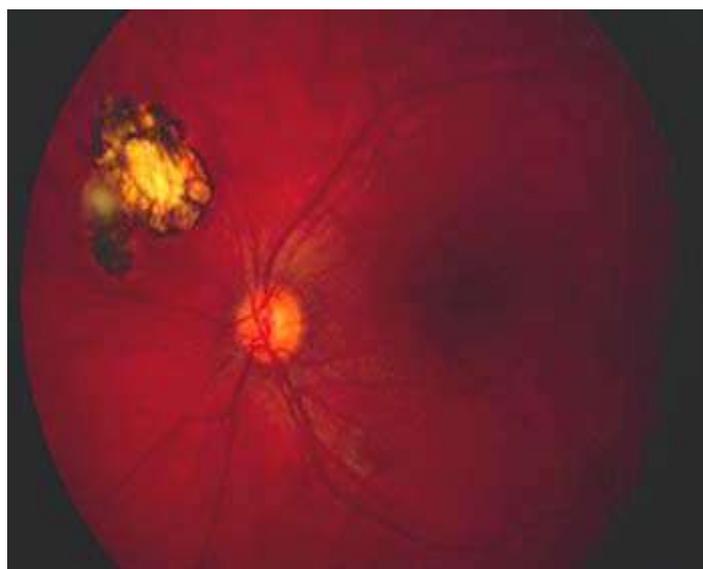


Figure 11 : Lésion de chorio-rétinite.

Les toxoplasmoses congénitales graves sont de plus en plus rares. Les formes infra cliniques sont les plus fréquentes. Cette situation est la conséquence d'une prise en charge efficace des femmes enceintes : prévention primaire et secondaire, traitement des femmes ayant fait une séroconversion en cours de grossesse, diagnostic prénatal, traitement de l'enfant et recours à une IMG en cas d'atteinte neurologique ou viscérale grave.

La majorité actuelle de formes latentes ne dispense pas d'une surveillance rigoureuse des enfants, clinique et sérologique. Celle-ci a pour but de dépister et traiter la plus fréquente des manifestations tardives de la toxoplasmose congénitale : la chorioretinite.

Chez l'enfant, les formes cliniques de toxoplasmose congénitale sont le plus souvent des formes latentes, les formes graves étant devenues de plus en plus rares en France.

Néanmoins, une surveillance au long cours de ces enfants est indispensable pour dépister les atteintes oculaires tardives.

5. Traitements

Les médicaments reconnus actifs contre *T.gondii* sont limités et se regroupent en deux grandes familles : les inhibiteurs de synthèse de l'acide folique et les macrolides (Derouin et Santillana-Hayat, 2000). Ces médicaments sont actifs sur les tachyzoïtes mais sans effet sur les kystes (AFSSA 2005).

❖ Les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique :

Ils comprennent les **inhibiteurs de la déhydrofolate réductase (DHFR)** et les **sulfamides**. Leur effet antiparasitaire est puissant mais ils ne sont pas dénués d'effets indésirables car ils interfèrent aussi sur la synthèse de l'acide folique de l'hôte.

➤ Parmi les inhibiteurs de la DHFR, le plus actif est la **pyriméthamine**, parasiticide sur les tachyzoïtes à de faibles concentrations, franchissant le placenta.

➤ De nombreux sulfamides sont actifs sur *T.gondii* et leur choix est surtout orienté par leur pharmacocinétique : **sulfadiazine** (1/2 vie courte, d'environ 10 à 12 heures), **sulfadoxine** (sulfamide retard, moins actif mais dont l'administration peut être hebdomadaire).

L'association d'un inhibiteur de la DHFR et d'un sulfamide est synergique sur *T.gondii*. L'usage de cette association est basé sur des études animales réalisées dans les années 50 et a été récemment réévalué. Les auteurs soulignent aussi le fait que d'autres molécules, potentiellement très actives sur *T.gondii*, telles que l'**azithromycine**, la **clindamycine** ou l'**atovaquone**, sont disponibles mais manquent encore d'essais cliniques à grande échelle. La plus prometteuse semble être l'atovaquone et des études sur des souris suggèrent qu'elle pourrait avoir un effet sur les kystes intratissulaires. Malheureusement, cette thérapeutique n'a pas encore l'agrément pour être utilisée chez les femmes enceintes et les jeunes enfants (Petersen et Schmidt, 2003).

Parmi les associations les plus actives, figurent **pyriméthamine + sulfadiazine** ou **pyriméthamine + sulfadoxine**. Elles sont utilisées en priorité pour le traitement et la prophylaxie secondaire des formes graves de toxoplasmose.

Elles ont comme inconvénients des effets indésirables hématologiques (**neutropénie**, thrombopénie), nécessitant l'administration systématique d'acide folinique, et/ou de signes d'intolérance cutanée, parfois graves (syndrome de Lyell, épidermolyse).

❖ Macrolides :

La **spiramycine** est le principal macrolide utilisé dans le traitement de la toxoplasmose acquise et en cours de grossesse. Sa tolérance est généralement bonne mais son effet parasitostatique ne s'observe qu'à des concentrations élevées, or ces concentrations ne sont atteintes que dans certains tissus, comme le foie ou le poumon, mais pas dans le cerveau ou l'œil.

D'autres médicaments ont montré une activité sur *T.gondii*, en particulier l'**atovaquone** ayant une activité sur les tachyzoïtes et les kystes, mais qui n'ont encore qu'une utilisation limitée du fait d'une mauvaise biodisponibilité.

D'autres alternatives thérapeutiques existent mais sont surtout réservées au traitement de deuxième intention en cas d'infection **VIH** chez le patient. Ainsi il est conseillé de faire

suivre une *prophylaxie primaire chez les patients VIH+ ayant une sérologie de la toxoplasmose positive et des CD4 <200/mL.*

Si la sérologie est négative, il faudra dispenser des conseils prophylactiques : pas de contact avec la litière de chats, viande bien cuite ou congelée préalablement 2 jours, lavage des fruits et légumes.

La stratégie thérapeutique adoptée en cas de séroconversion maternelle sera abordée plus tard ainsi que la prise en charge thérapeutique des enfants atteints de toxoplasmose congénitale.

(cf. paragraphe III .4)

<p>Plusieurs médicaments actifs sur <i>T.gondii</i> sont disponibles. Le traitement est en général basé sur l'utilisation de spiramycine seule ou sur l'association de pyriméthamine et d'un sulfamide (sulfadiazine ou sulfadoxine) selon l'atteinte clinique.</p>
--

III. Diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale

Dans la plupart des cas, la sérologie représente la base du dépistage et du diagnostic. Des techniques complémentaires cherchant à mettre en évidence le parasite directement (PCR, inoculation à l'animal) sont de plus en plus utilisées, en particulier dans le domaine de la toxoplasmose congénitale, et restent le diagnostic de certitude.

Le diagnostic doit être performant pour prouver la séroconversion maternelle et précis pour la dater le plus finement possible. Il doit ensuite pouvoir apporter des preuves quant à l'atteinte ou non de l'enfant, que ce soit en période anténatale ou postnatale (Derouin 2002).

1. Diagnostic de la séroconversion maternelle

Il repose sur la sérologie, pratiquée mensuellement chez toute femme enceinte séronégative (décret du 17 mars 1978). La Nomenclature des Actes de Biologie Médicale publiée au

Journal Officiel du 7 avril 1985 impose un diagnostic sérologique avec titrage (en Unités Internationales pour les IgG) par au moins 2 techniques (cotation B60). Si l'examen est prescrit pendant une grossesse, une des techniques doit permettre de déceler les IgM.

1.1. Techniques utilisant des antigènes figurés

Les techniques sérologiques utilisent des **antigènes figurés** (trophozoïtes entiers, vivants ou fixés) ou des **antigènes solubles** composés d'extraits de tachyzoïtes plus ou moins purifiés.

Les premières détectent des anticorps dirigés contre les antigènes membranaires, en particulier la protéine p30, composant majeur de la membrane. Ce sont les techniques les plus précoces et les plus sensibles, car elles mettent en évidence des anticorps produits précocement au cours de l'infection toxoplasmique.

Pour améliorer leurs performances, les antigènes solubles utilisés dans la 2^{ème} technique sont le plus souvent enrichis avec un antigène membranaire (p30 ou SAG1).

❖ Test de lyse des toxoplasmes ou « Dye Test », de Sabin et Feldman (1948) :

C'est la technique de référence, très sensible et spécifique. Elle n'est pratiquée que dans des centres de référence. Elle consiste à mettre en présence des toxoplasmes vivants (d'où la contrainte de leur entretien) avec le sérum à tester et un sérum humain sérologienégatif pour la toxoplasmose servant de source de complément. Les formes « tuées » par les anticorps (IgG surtout) du patient sont ensuite numérées (microscopie en contraste de phase). La réaction est positive quand 50% des toxoplasmes sont lysés et le titre est exprimé en UI/mL, avec un sérum étalon de l'OMS.

Cette technique a l'avantage d'être positive précocement (10-15 jours après contamination), très sensible et spécifique, persistant à taux faible toute la vie, mais est néanmoins délicate et non automatisable.

❖ L'immunofluorescence indirecte (IFI) : *après avoir été à la base du diagnostic de toxoplasmose pendant des années, elle a été peu à peu supplantée par des techniques plus modernes et performantes.*

Cette technique utilise des tachyzoïtes formolés et fixés sur une lame à puits. Après incubation du sérum à différentes dilutions, la fixation des anticorps spécifiques est révélée par une anti-globuline marquée à la fluorescéine. La lecture au microscope à fluorescence

permet d'établir un titre, correspondant à la dernière dilution pour laquelle l'intégralité de la membrane des parasites apparaît bien fluorescente.

L'IFI permet le titrage des IgG et IgM, mais la lecture paraît délicate pour certains sérums.

Elle présente les avantages d'être précoce, simple et peu coûteuse, mais semble moins sensible et spécifique : il existe de faux positifs en IgG en présence d'Ac anti-nucléaires et de faux positifs en IgM avec le facteur rhumatoïde. De plus, un fort taux d'IgG peut donner des réactions faussement négatives en IgM, d'où la recommandation de traiter systématiquement les sérums par un absorbant des IgG.

❖ Techniques d'agglutination :

Des dilutions du sérum du patient sont incubées avec des suspensions de toxoplasmes. L'agglutination est observée à l'œil nu : une réaction positive se caractérise par un voile, une réaction négative par un point au fond de la cupule. Il s'en suit la détermination d'un titre en fonction de la dernière dilution positive.

➤ Agglutination directe : *peu utilisée...*

La technique est effectuée avant et après traitement par le 2-mercaptoéthanol qui dissocie les IgM. Une différence d'au moins 3 titres entre l'agglutination du sérum non traité et celle du sérum traité est nécessaire pour conclure à la présence d'IgM spécifiques.

Les IgG et IgM sont détectées, avec une grande sensibilité envers les IgM. Elle est utile en cas d'infection très récente, mais sa sensibilité est faible pour détecter les anticorps résiduels (faibles titres d'IgG). Elle n'est pas automatisable et rend de faux positifs avec les Ac naturels.

➤ Agglutination sensibilisée : (*ToxoScreen® de BioMérieux*) *peu utilisée...*

Les toxoplasmes formolés sont sensibilisés par la trypsine, ce qui confère une plus grande sensibilité aux IgG spécifiques mais aussi aux IgM naturelles. C'est pourquoi le sérum doit être traité par le 2-mercaptoéthanol, et seul le titrage des IgG est permis. Cette technique simple est très sensible (2 à 4 UI/mL), mais coûteuse, non automatisable.

➤ ISAGA (ImmunoSorbent Agglutination Assay) :

Cette technique est appliquée à la détection des IgM, IgA voire IgE.

La première étape consiste en l'immunocapture par des anticorps anti-chaînes lourdes (μ ou α) des IgM ou IgA. Les Ac spécifiques sont alors révélés par agglutination en présence de

suspensions de toxoplasmes formolés à 3 concentrations croissantes. Pour chaque cupule, on attribue un score de 0 à 4 selon l'intensité du voile formé. Le résultat est semi quantitatif, avec un score de 0 à 12.

Un score de 0 à 5 est considéré négatif ; de 6 à 8, équivoque ; de 9 à 12, positif.

Cette technique est simple, mais de lecture parfois un peu délicate. Elle n'est pas influencée par les facteurs rhumatoïdes ; elle est très sensible et précoce, mais a l'inconvénient de rester positive avec un score élevé parfois largement plus d'un an après la séroconversion (Desmonts, Naot et coll. 1981).

1.2. Techniques utilisant des antigènes solubles

Les antigènes solubles sont obtenus par traitement physico-chimique des parasites, suivi d'une purification. Ce sont des extraits d'antigènes somatiques seuls ou d'antigènes somatiques et membranaires mélangés.

❖ Hémagglutination :

La réaction est basée sur l'agglutination d'hématies de mouton sensibilisées par l'antigène toxoplasmique. La réaction est réalisée sur plaques avec des dilutions séquentielles du sérum et lue après 2 à 8 heures d'incubation. Elle peut se faire sur sérum traité au 2-mercapto-éthanol inactivant les IgM, ce qui donne alors uniquement le titre des IgG, ou sur sérum non traité, ce qui donne un titre correspondant aux IgG, IgM et Ac naturels. La différence de titre entre les deux réactions fait suspecter la présence d'IgM immunes ; du fait de la présence d'IgM naturelles, on ne peut suspecter la présence d'IgM spécifiques que pour des différences supérieures à 2 titres entre sérum non traité et sérum traité.

Un témoin sérum du malade/ hématies non sensibilisées est toujours fait en parallèle pour vérifier l'absence d'agglutination non spécifique.

Cette technique a rendu bien des services pendant des années mais est assez peu spécifique et a été délaissée au fil du temps, au profit de nouvelles techniques.

❖ Latex :

La technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées est d'une grande simplicité pour la recherche *d'anticorps totaux*.

Elle ne permet pas de titrage précis et ne peut être utilisée que pour un tri des sérums, en préalable à d'autres techniques de titrage.

De plus, des phénomènes de zone sont responsables de « faux négatifs » pour des sérums ayant un titre élevé en IgG.

❖ Réactions immunoenzymatiques : ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) :

Ce sont des techniques très largement répandues dans de nombreux laboratoires du fait de leur simplicité et de leur automatisation. De multiples trousseaux sont commercialisés pour la toxoplasmose, permettant la recherche et le titrage des IgG, IgM (techniques de première intention dans le diagnostic) et des IgA (deuxième intention).

➔ Pour les **IgG**, la technique *d'ELISA indirecte « classique »* est utilisée, permettant un titrage précis des anticorps.

L'antigène est fixé sur une phase solide ; les anticorps du patient, s'ils sont présents, s'y fixent ; après lavage, un conjugué anti-IgG est ajouté, couplé à une enzyme ; la dernière étape est la transformation d'un substrat incolore en produit coloré par cette enzyme, la réaction colorimétrique est mesurée (spectrophotomètre) et la densité optique (D.O) obtenue est ensuite convertie par comparaison avec une courbe étalon établie avec une gamme de sérums titrés.

Les avantages de l'ELISA sont évidents : lecture objective des réactions, possibilité de traiter de grandes séries par l'automatisation, reproductibilité des résultats. Une des limites de la technique est l'obligation de diluer les sérums en cas de titres élevés (problème d'étendue de la gamme).

➔ Pour les **IgM** et **IgA**, la technique *d'ELISA inverse ou immunocapture* est utilisée.

L'anticorps spécifique anti- μ ou α est fixé sur le support ; les anticorps du patient, des isotypes correspondants, sont retenus ; après lavage, un antigène est ajouté, directement marqué par une enzyme ou couplé à un anticorps marqué par l'enzyme ; ajout du substrat de l'enzyme transformé en produit coloré et mesure de D.O.

❖ Mesure de l'avidité des IgG (adaptations de techniques ELISA indirectes) :

L'avidité exprime l'affinité des anticorps pour les antigènes. C'est une méthode complémentaire pour **dater** l'infection.

Elle augmente au cours de l'évolution de la réponse humorale : **les IgG sont de faible affinité au début de l'infection et de forte affinité en cas d'infection ancienne.**

La réaction repose sur l'adaptation des techniques ELISA indirectes : pour un même sérum, on compare l'intensité de la réaction obtenue en présence d'un agent dissociant la liaison Ag-Ac avec celle de la réaction « classique » sans agent dissociant. Seuls les anticorps de faible affinité sont éliminés, ce qui donne une intensité de réaction beaucoup plus faible qu'en l'absence d'agent dissociant. Les Ac de forte affinité, eux, restent fixés et les intensités des deux réactions sont de ce fait assez proches.

L'avidité est exprimée par le rapport du résultat avec agent dissociant sur celui sans cet agent. L'agent dissociant le plus utilisé est l'urée.

Le rendu du résultat et en particulier la notion de seuil de l'indice d'avidité peut varier selon la trousse utilisée. Néanmoins, il est admis qu'**un indice d'avidité élevé permet de conclure à une infection ancienne** ; par contre, un faible indice d'avidité n'est pas un critère absolu d'infection récente car chez certains sujets l'augmentation de l'avidité reste lente.

Par exemple, avec la technique VIDAS (laboratoire BioMérieux) que nous avons au laboratoire de Nantes, un indice d'avidité $>0,3$ permet d'exclure l'hypothèse d'une infection de moins de 4 mois.

C'est une technique simple, reproductible et transférable, mais relativement coûteuse.

Son principal avantage est de permettre d'exclure une infection récente lorsque les résultats des autres techniques sérologiques ne permettent pas de conclure, ce qui est un problème fréquent sur certains bilans sérologiques de début de grossesse (Lappalainen et Hedman 2004; Tanyuksel, Guney et coll. 2004).

De nombreuses techniques sont disponibles pour le diagnostic d'une séroconversion maternelle (ELISA, agglutination, immunocapture, latex ou test de lyse) : elles sont complémentaires les unes des autres.

Il est obligatoire de procéder au diagnostic chez la femme enceinte par au moins 2 techniques, avec un titrage des IgG et au minimum l'une des deux techniques permettant de déceler les IgM.

1.3. Interprétation des sérologies maternelles

Il est recommandé de confirmer tout résultat positif par une deuxième technique.

Pour interpréter au mieux les résultats des sérologies, il convient de connaître la cinétique des anticorps spécifiques.

Suite à la contamination, on ne détecte pas d'Ac pendant une dizaine de jours.

Les premiers Ac synthétisés sont les **IgM**, 8 à 10 jours après la contamination. Ils augmentent le mois suivant puis diminuent et persistent durant une période plus ou moins longue selon les individus. Il est important de garder à l'esprit que les résultats ne peuvent être interprétés que s'il sont obtenus *avec la même technique*, car les seuils de détection sont variables selon les techniques. Deux résultats obtenus par 2 techniques différentes ne doivent en aucun cas être comparés.

Le taux maximal est atteint entre 1 et 6 semaines avec la technique ISAGA et entre 2 et 18 semaines pour une technique immunoenzymatique (Desmonts et Couvreur 1984).

Les IgM ne peuvent plus s'interpréter uniquement comme le témoin d'une infection récente avec les techniques utilisées actuellement car on peut les détecter longtemps après l'infection aiguë, fréquemment 1 an après la contamination. Ainsi dans l'étude de Gras publiée en 2004, sur une cohorte de 446 femmes enceintes ayant fait une séroconversion pergestationnelle, les IgM étaient détectées plus longtemps avec l'ISAGA (moyenne de 12,8 mois) qu'avec l'immunofluorescence (10,4 mois). Le point à noter était qu'elles pouvaient être mises en évidence jusqu'à 2 ans chez 27% des femmes avec l'ISAGA, contre 9% avec l'immunofluorescence (Gras, Gilbert et coll. 2004).

Des IgM non spécifiques peuvent aussi être détectées sans qu'il y ait infection, ce qui complique encore l'interprétation. Nous le détaillerons un peu plus loin.

Les **IgG** apparaissent environ 1 semaine après les IgM, les premières synthétisées étant celles dirigées contre la membrane du parasite (protéine p30). Elles augmentent ensuite pour atteindre leur maximum en 2 mois. Des titres élevés persistent plusieurs mois puis diminuent lentement. Avec les techniques utilisant des extraits antigéniques solubles, l'apparition des IgG est retardée et le maximum atteint plus tard.

Ces différences de cinétique peuvent aider à la datation de l'infection. Selon la technique utilisée (et donc selon la préparation antigénique utilisée), la cinétique des anticorps ne sera pas la même.

Par exemple, on sait que les IgG apparaissent plus tôt avec la technique AxSYM qu'avec le VIDAS. Des IgG positives en AxSYM et encore négatives en VIDAS peuvent être en faveur d'une infection très récente. Leur taux est plus élevé qu'en VIDAS pendant quelques semaines, pour finir par croiser aux alentours de 5 à 6 mois, où les taux en VIDAS sont alors supérieurs (ainsi des IgG plus élevées en VIDAS qu'en AxSYM nous orientent plutôt vers une infection chronique). Ces constatations sont empiriques et doivent absolument être étayées par d'autres arguments pour dater l'infection. Néanmoins, elles peuvent être une aide supplémentaire à cette datation.

Dans l'étude de Press parue en 2005, sur un seul sérum de femmes en début de grossesse, le seul fait d'avoir des IgG positives par le Dye Test, des IgM positives en ELISA et des IgG encore négatives en VIDAS leur fait suspecter fortement une séroconversion récente et recommander la mise sous traitement immédiate (Press, Montoya et coll. 2005).

La détection d'IgM permet de suspecter rapidement une séroconversion, mais seule l'apparition d'IgG permettra d'authentifier la primo-infection, du fait de la présence possible d'IgM non spécifiques. En l'absence de mise en évidence d'IgM, quel que soit le titre d'IgG, faible, moyen ou fort, mais avec la notion de **stabilité des IgG**, l'immunité est acquise. Dans de très rares cas de séroconversions sans IgM (3 %), le diagnostic sera porté sur l'ascension du taux des IgG sur deux prélèvements successifs, ainsi que sur des techniques complémentaires, avidité des IgG voire IgA.

Les **IgA** ont dans le premier mois une cinétique proche de celle des IgM. Elles sont détectées dans 80 à 95% des cas de séroconversion selon les études. Leur taux est maximal après 2 à 3 mois, puis sont en général négatives vers 1 an. Leur présence inconstante limite leur usage dans le diagnostic (Bessieres, Roques et coll. 1992).

L'interprétation de la sérologie maternelle se fait en fonction de :

- la présence ou l'absence d'IgM spécifiques
- la présence ou l'absence d'IgG spécifiques
- la présence ou l'absence d'IgA spécifiques
- la cinétique des IgG qui permet de préciser le stade évolutif de l'infection. Cependant,

le titre d'anticorps varie sensiblement d'une technique à l'autre, donc seule **l'analyse en parallèle de 2 sérums, prélevés à 3 semaines d'intervalle, dans le même laboratoire, par**

la même technique et dans la même série permet d'apporter une conclusion définitive sur l'évolution du titre des IgG.

Les principales difficultés sérologiques rencontrées par les biologistes sont au nombre de 4 et justifient souvent de l'envoi du sérum dans un centre plus spécialisé (Cimon 2002).

- 73% des demandes d'expertise concernent l'interprétation d'un profil sérologique associant IgG et IgM chez une femme enceinte, posant alors le problème de datation de l'infection par rapport au début de la grossesse.
- Dans 14% des cas, des sérums ayant un taux limite ou très faible d'IgG sont adressés pour préciser le statut immunitaire.
- 5% des expertises portent sur des sérums ayant des IgM positives seules, pouvant signifier une toxoplasmose débutante ou une réponse IgM faussement positive.
- 3% des envois enfin portent sur des sérums voyant augmenter leur taux d'IgG de façon significative, sans IgM associées.

Classiquement, on distingue 4 situations : (figure 12)

- Absence d'IgG et d'IgM :

Cette situation correspond au profil d'une femme non immunisée : celle-ci doit alors être considérée à risque et suivie mensuellement jusqu'à l'accouchement et 1 mois après dans l'idéal, pour ne pas passer à côté d'une séroconversion de toute fin de grossesse (Wirden, Botterel et coll. 1999).

Des mesures prophylactiques strictes doivent être suivies.

- Présence d'IgG sans IgM :

Ce profil peut correspondre à une immunisation ancienne mais se doit d'être confirmé sur un deuxième sérum, à 3-4 semaines d'intervalle.

Si le titre d'IgG est stable, la femme est immunisée et n'a plus besoin d'être suivie ultérieurement.

Si le titre augmente, il peut s'agir d'une réactivation toxoplasmique (intérêt des IgA dans cette indication) ou d'une réinfestation sans risque pour le fœtus dans l'immense majorité des cas.

Dans l'étude publiée par Cimon en 2002, il est conseillé en cas d'ascension des IgG seules de faire une avidité des IgG pour différencier un rebond sérologique d'une séroconversion

atypique sans IgM. En effet, dans les cas de séroconversion sans IgM, l'indice d'avidité sera faible ($<0,3$) alors que dans un rebond sérologique, cet indice sera élevé ($<0,5$ en général) compatible avec une infection ancienne.

Dans cette même étude, le problème des taux faibles d'IgG est également soulevé. Cette valeur faible est-elle le témoin d'un titre significatif en anticorps spécifiques ? La patiente doit-elle être considérée immunisée et donc plus surveillée, ou au contraire incluse dans un groupe à risque surveillé mensuellement ?

Il est alors conseillé de réaliser une seconde technique de détection des IgG comme le prévoit la législation (J.O du 28 avril 1995). Ainsi, au laboratoire du CHU de Nantes, il est effectué dans un premier temps la technique AxSYM puis le VIDAS dans un 2^{ème} temps si nécessaire.

• Si les 2 tests sont positifs, l'analyse d'un second sérum 3 semaines plus tard devra confirmer ce taux significatif d'anticorps, ce qui rend inutile la surveillance sérologique ultérieure.

• S'il y a une discordance entre les deux tests, il est prudent de considérer la patiente comme exposée au risque d'infection, donc de lui rappeler les mesures prophylactiques et de la surveiller sérologiquement pendant sa grossesse (Cimon 2002).

- Présence d'IgM sans IgG :

Ce profil peut correspondre à 2 situations très différentes : réaction non spécifique dans la détection des IgM ou infection toxoplasmique débutante, dépistée au stade où les IgG n'ont pas encore été synthétisées.

Pour trancher, il est souhaitable de réaliser sur le même prélèvement une seconde technique de détection des IgM, telle l'ISAGA (BioMérieux), qui se positive habituellement très tôt en début d'infection et possède par ailleurs une bonne spécificité (Desmonts, Naot et coll. 1981).

Ainsi, lorsque la seconde technique ne retrouve pas d'IgM, une fausse réaction positive liée à la première technique est alors évoquée.

Dans tous les cas, il est indispensable de réaliser un contrôle sérologique à distance, 2 à 3 semaines après le premier prélèvement (voire plus rapproché, vers 7 à 10 jours). S'il y a apparition d'IgG sur le second sérum, l'infection est confirmée, par contre, si le profil est resté identique, l'infection débutante peut être écartée.

Le pourcentage d'IgM non spécifiques est variable d'une technique à l'autre et dépend de la préparation antigénique utilisée et du seuil de positivité retenu (Konishi 1993; Liesenfeld, Press et coll. 1997).

- Présence d'IgG et d'IgM :

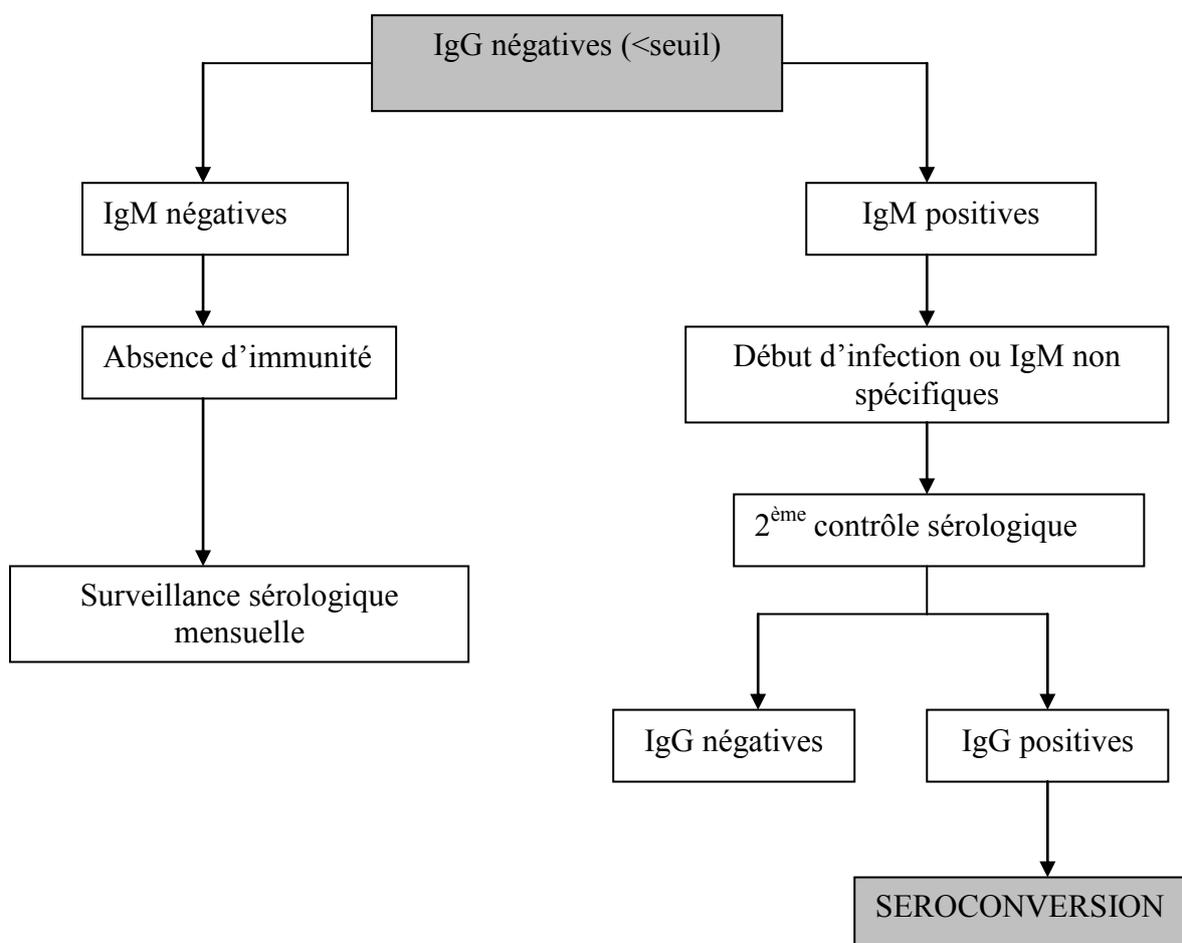
Il est, dans ce cas de figure, impératif de trancher entre infection évolutive (qui nécessite obligatoirement d'être datée par rapport au début de la grossesse) et infection ancienne avec persistance d'IgM résiduelles.

La notion de sérologie antérieure connue est capitale. Si elle était négative, la séroconversion semble évidente et doit être confirmée impérativement sur un deuxième prélèvement.

S'il n'y avait pas de sérologie antérieure connue, il faut également demander un 2^{ème} prélèvement, dans un intervalle de 3 semaines avec le premier.

Sur celui-ci, l'ascension significative du taux d'IgG traduit une infection évolutive alors que la stabilité de ce taux permet de situer l'infection au moins deux mois avant le premier prélèvement (Holliman 1995).

Dans tous les cas, face à un profil associant IgG et IgM positives chez une femme enceinte, il convient de tout mettre en œuvre pour **dater** le plus précisément possible l'infection, par des techniques complémentaires telles que l'avidité des IgG +/- les IgA, ce que nous allons développer dans le paragraphe suivant.



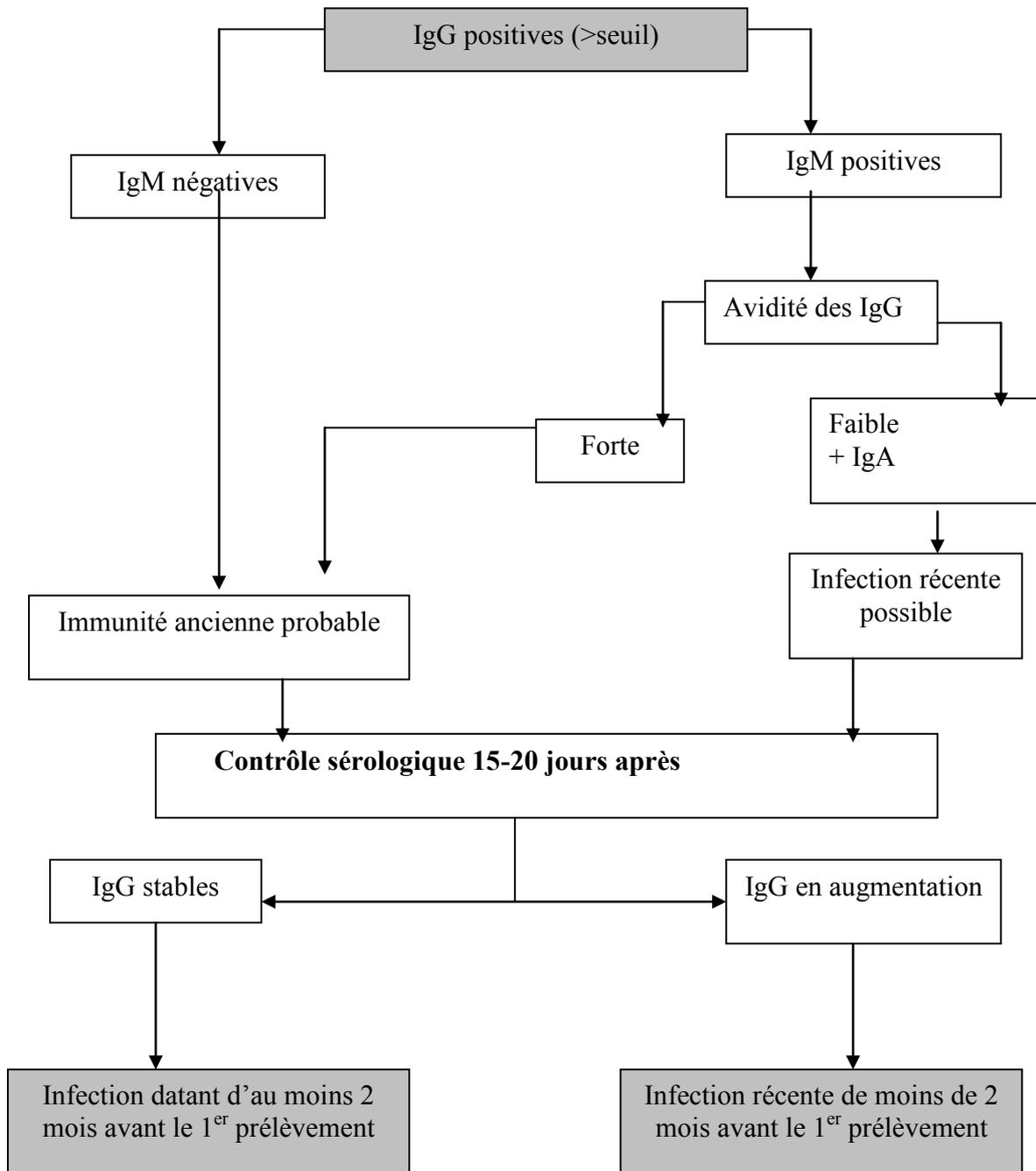


Figure 12 : Conduite à tenir devant une sérologie toxoplasmique chez la femme enceinte immunocompétente (adapté de Bessières, 2003)

La présence d'IgM n'est pas obligatoirement synonyme d'infection récente. Inversement leur absence ne permet pas d'exclure une séroconversion. La cinétique des IgG, le dosage des IgA et la mesure de l'avidité des IgG sont des outils précieux pour affirmer la séroconversion, puis pour la dater dans le cas des femmes enceintes.

1.4. Datation de la contamination maternelle

Celle-ci repose avant toute chose, et de nombreuses études en témoignent, sur la combinaison de plusieurs méthodes, aucune n'étant à elle seule capable de résoudre le problème de datation dans de nombreux cas de figures (Roberts, Hedman et coll. 2001).

❖ Etude de l'avidité des IgG :

En premier lieu, la technique d'**avidité des IgG** est employée, et c'est là son indication principale : exclure une infection récente (Remington, Thulliez et coll. 2004; Fricker-Hidalgo, Saddoux et coll. 2006).

Ces auteurs démontrent l'utilité du test VIDAS pour l'avidité des IgG, techniques complémentaires aux techniques sérologiques de 1^{ère} intention. Ce test permet d'orienter vers une infection ancienne ou plus récente, en fixant la barre à **4 mois** avant le prélèvement. Ainsi, il permet l'exclusion, ou non, d'une infection de moins de 4 mois. Ce délai est particulièrement intéressant pour les sérums de début de grossesse (1^{er} trimestre) qui montrent une positivité des IgG et des IgM. Avant de débiter un traitement par Rovamycine® et d'enclencher toute la surveillance drastique qui s'ensuit lors d'une suspicion de séroconversion pergestationnelle, la réalisation de l'avidité est capitale car elle va permettre dans une large proportion de cas de dater l'infection à plus de 4 mois avant le prélèvement, donc en période anticonceptionnelle.

Dans l'étude de Remington parue en 2004, les auteurs insistent sur l'utilité de ce test aux Etats-Unis, où les femmes enceintes n'ont pas de suivi systématique mensuel mais seulement

l'analyse d'un sérum de début de grossesse. En cas d'IgG et IgM positives, une avidité élevée (>0,3) permettant d'exclure une infection de début de grossesse, bon nombre de femmes qui devaient être traitées ne l'ont pas été grâce au résultat élevé de l'avidité (Remington, Thulliez et coll. 2004).

Une telle constatation a également été faite par Montoya et coll. en 2002 dans leur étude portant sur le test VIDAS pour l'avidité des IgG. Sur une sélection de 132 femmes enceintes de moins de 16 SA, à partir d'un seul sérum ayant montré des IgG et des IgM positives ou limites tout du moins, l'avidité est revenue élevée pour 75 % des prélèvements. De plus, sur 39 femmes auxquelles un traitement avait été fortement recommandé, 49 % d'entre elles ont pu ne pas le recevoir grâce à une avidité élevée qui datait l'infection en période anticonceptionnelle (Montoya, Liesenfeld et coll. 2002).

L'étude de Tanyuksel et coll. parue en 2004 est plus critique quant au bénéfice important de la technique. Pour ces auteurs, même si elle reste une technique de choix chez les femmes enceintes, elle ne devrait pas être utilisée seule pour dater l'infection dans certains cas de figure : en particulier, lorsque le taux est bas ou limite (existence d'une « zone grise » entre 0,2 et 0,3). En effet, certains sérums gardent une avidité basse plusieurs mois après l'infection (jusqu'à 1 an même !)

De plus, la technique ne peut être utilisée qu'à partir d'un certain taux d'IgG (15 UI/mL avec le VIDAS), donc est inexploitable pendant un certain laps de temps.

L'association à d'autres techniques complémentaires, et en particulier le dosage des IgA, semble recommandable dans ces situations particulières (Tanyuksel, Guney et coll. 2004).

❖ Dosage des IgA :

La présence d'IgA peut aider à affiner la datation de la séroconversion maternelle dans les cas où l'avidité n'est pas catégorique. On sait en effet qu'un taux élevé d'IgA est en faveur d'infection récente.

En outre, les IgA disparaissent en général en 7 à 8 mois ce qui peut aider en cas de sérum avec des IgG et M positives et une avidité restant basse. Il convient de se méfier cependant du fait que la durée de production des IgA est variable d'un individu à l'autre et qu'environ 5% des séroconversions n'ont pas d'IgA.

Il faut de toutes les façons garder à l'esprit qu'un contrôle sur un deuxième prélèvement 3 semaines après le premier est toujours souhaitable pour conforter le diagnostic.

2. Diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale

Toute toxoplasmose évolutive en cours de grossesse expose au risque de transmission au fœtus, et à des conséquences cliniques variables mais potentiellement gravissimes en fonction de la date de la contamination maternelle.

Le diagnostic prénatal a pour but de dépister *in utero* les fœtus atteints et en cas de positivité, d'adapter le traitement et la surveillance ou d'envisager une interruption médicale de grossesse dans les cas les plus graves.

Le diagnostic prénatal comporte une **surveillance échographique mensuelle** et un **prélèvement de liquide amniotique**, en vue de la recherche directe du parasite (PCR, inoculation à la souris).

Il est indiqué pour toute séroconversion toxoplasmique survenue pendant la grossesse, à l'exclusion des situations particulières suivantes :

- Séroconversion survenue en *période périconceptionnelle*, c'est-à-dire allant de 1 mois avant la conception jusqu'à 15 jours après.

- Séroconversion survenue *après 26 semaines d'aménorrhée*.

(Recommandations du réseau « Sécurité Naissance – Naître ensemble », des Pays de la Loire).

Il est à noter que le diagnostic prénatal par amniocentèse à la recherche du parasite peut être pratiqué pratiquement jusqu'au terme de la grossesse, en cas d'infection tardive en particulier. La conduite à tenir est variable selon les auteurs : Pelloux en 1998 n'excluait pas du tout la pratique de l'amniocentèse au 9^{ème} mois de grossesse pour des contaminations du 8^{ème} mois, contrairement à d'autres centres comme ceux des Pays de la Loire qui, considérant le risque de transmission suffisamment élevé et voulant éviter le risque d'accouchement prématuré déclenché par le geste, traitent systématiquement la mère par l'association Malocide® + Adiazine® (Pelloux, Guy et coll. 1998).

2.1. Analyse du liquide amniotique

Le diagnostic biologique prénatal se fait sur le seul prélèvement de liquide amniotique (LA). La ponction de sang fœtal, pratiquée avant 1995, ne se fait plus car bien moins fiable et plus risquée pour le fœtus.

Un certain nombre de documents administratifs obligatoires doivent être joints au prélèvement (arrêté du 12 novembre 1997) :

- Une fiche de renseignements indiquant le résultat des sérologies réalisées chez la mère, le traitement en cours et les signes échographiques éventuels.
- Une attestation de consultation préalable, complétée et signée par le médecin préleveur.
- Un formulaire de consentement de la femme enceinte.

La majorité des centres préconise l'amniocentèse **entre 18 SA**, en raison du risque de lésions des membranes en cas de prélèvement plus précoce, **et 38 SA**. Quelques centres n'en font plus après 30 voire 26 SA, d'autres en font jusqu'au terme.

Un délai incompressible de **3 à 4 semaines** après la date de la séroconversion doit être impérativement respecté, en raison du délai de transmission du parasite à travers le placenta.

Deux flacons stériles contenant chacun 10 mL de liquide amniotique sont prélevés et doivent être rapidement acheminés au laboratoire, si possible dans les 4 heures suivant le prélèvement. Un flacon est destiné à la recherche du génome de *T.gondii* par PCR, l'autre à l'inoculation intra péritonéale à un lot de souris.

Dans la région des Pays de la Loire, seuls les laboratoires de Parasitologie Mycologie des CHU de Nantes et d'Angers possèdent l'agrément ministériel autorisant la pratique du diagnostic biologique prénatal de la toxoplasmose (décret n° 95-559 du 6 mai 1995).

Il existe 3 techniques pour rechercher *T.gondii* sur le prélèvement de liquide amniotique :

➤ **Les cultures cellulaires :**

obsolète...

Elles se font sur cellules fibroblastiques de type MRC5 et nécessitent 3 à 5 jours avant d'obtenir un résultat. Cette technique n'est quasiment plus pratiquée car elle est d'interprétation délicate et surtout de sensibilité inférieure aux autres méthodes (Robert-Gangneux, Gavinet et coll. 1999). Elle a été supplantée par les techniques de biologie moléculaire dans la plupart des laboratoires, techniques permettant d'obtenir un résultat encore plus rapidement.

➤ **L'inoculation à la souris :**

C'est la technique la plus ancienne, utilisée depuis plus de 25 ans. Après inoculation intra péritonéale de liquide amniotique à plusieurs souris (jusqu'à 10 en général), une surveillance sérologique des animaux est faite à 3 et 6 semaines. Les Ac spécifiques présents dans leur sérum sont mis en évidence par l'agglutination de toxoplasmes formolés. L'emploi d'un tampon de dilution au 2-ME permet d'affirmer la présence d'IgG spécifiques si l'on constate une réaction positive (ToxoScreen® DA, bioMérieux).

En cas de positivité, la souris est sacrifiée dans le but de mettre en évidence des kystes intra cérébraux à l'examen microscopique.

L'intérêt de cette technique est une spécificité excellente (100%), associée à une assez bonne sensibilité : 70% dans l'étude de Bessières de 2002 , 61% dans l'étude de Antsaklis de 2002, 70% dans l'étude de Grover de 1990 (Grover, Thulliez et coll. 1990; Antsaklis, Daskalakis et coll. 2002).

L'inoculation à la souris permet de confirmer les résultats obtenus par PCR et reste une technique de référence car elle permet d'isoler les souches et de les conserver pour études épidémiologiques.

L'analyse du liquide amniotique par inoculation aux souris reste une technique très spécifique et ayant une bonne sensibilité. Elle doit être associée aux techniques de biologie moléculaire.

➤ **La PCR :**

La PCR réalisée sur le liquide amniotique a fait l'objet d'études depuis 1989. Sa pratique est très réglementée et suit le décret du 6 mai 1995 (imposant une autorisation ministérielle, valable 5 ans, pour pratiquer ce diagnostic prénatal).

Le choix de la **cible** est très controversé et aucun consensus n'a encore été trouvé. Le plus souvent, le **gène B1**, répété 35 fois dans le génome de *T.gondii*, est utilisé comme cible.

L'étude de Chabbert en 2004 l'a démontré plus fiable que le gène P30, n'ayant qu'une seule copie.

Ce gène B1 a été l'un des premiers décrits pour la PCR sur *T.gondii* : ainsi, en 1996, Pelloux l'étudiait en parallèle des techniques conventionnelles (inoculation aux souris, cultures cellulaires du liquide amniotique, et techniques sérologiques). Sur 21 liquides amniotiques trouvés positifs par ces dernières, la PCR utilisant le gène B1 comme cible confirma tous ces résultats, se positionnant alors comme une technique prometteuse, tant par sa rapidité que par sa bonne sensibilité (Chabbert, Lachaud et coll. 2004).

Une nouvelle séquence cible a ensuite été décrite par Homan en 2000 : **séquence de 529 bp (paires de bases) répétée 200 à 300 fois sur le génome de *T.gondii* (renommée par la suite séquence RE, pour repeated element)**. Sur 60 souches testées de *T.gondii*, toutes possédaient ce fragment de 529 bp. De plus, la PCR faite à partir de cette cible s'était montrée plus sensible qu'avec le gène B1 (Homan, Vercammen et coll. 2000).

En 2003, Filisetti comparait l'inoculation de liquide amniotique aux souris avec 3 techniques de PCR utilisant des cibles différentes : gène B1, ADNr 18S et séquence AF146527 correspondant à la séquence RE. La sensibilité (42 %) et la spécificité (100 %) avec la séquence RE se révélèrent meilleures qu'avec B1 (26 % et 95 %), et sensiblement identiques avec l'ADNr 18S et l'inoculation aux souris.

Les auteurs soulignent donc l'intérêt de développer la séquence RE comme cible, en particulier au sein d'une technique de PCR temps réel (Filisetti, Gorcii et coll. 2003).

Enfin, en 2003, Reischl comparait ces deux cibles potentielles, le gène B1 et la séquence de 529 bp, sur 51 liquides amniotiques rendus positifs par les techniques classiques et montrait une meilleure sensibilité pour la séquence RE, ainsi que des spécificité, valeurs prédictives positive et négative à 100 %. De plus, cette séquence, très conservée au sein de l'espèce, a plus de copies que B1. Les auteurs recommandent donc son utilisation, au sein d'une technique de PCR temps réel, à développer (Reischl, Bretagne et coll. 2003).

Cette étude fut récemment confirmée par Edvinsson en 2006 qui a montré la supériorité du protocole amplifiant la séquence RE (Edvinsson, Lappalainen et coll. 2006).

⇒ Malgré ces résultats, le gène B1 continue à être la cible la plus utilisée.

Cette séquence de 529 bp pourrait être une cible intéressante dans l'avenir mais elle nécessite encore d'autres études à grande échelle pour remplacer éventuellement le gène B1.

Pour ce qui est des techniques, elles ont considérablement évolué. Il est à noter la grande diversité des protocoles « maison » pour la PCR qualitative et le manque de standardisation, constaté par plusieurs études. La nécessité d'un contrôle de qualité externe, devant l'hétérogénéité des résultats, s'impose, pour toutes les équipes utilisant la PCR dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (Pelloux, Guy et coll. 1998; Costa, Ernault et coll. 2001).

Les principales techniques utilisées sont :

- la PCR simple :

Utilisation d'un couple d'amorces ; révélation des produits d'amplification par le bromure d'ethidium (BET), après migration électrophorétique sur gel d'agarose ou de polyacrylamide.

- la PCR avec révélation des produits d'amplification par hybridation.

- la « nested-PCR » :

Ce sont des PCR successives destinées à amplifier spécifiquement une séquence ; on réalise une première PCR puis une deuxième PCR sur les produits de la première pour augmenter le rapport de spécificité. Cette technique permet d'augmenter la sensibilité (de 10^2 - 10^3) par rapport à la simple PCR, d'augmenter la spécificité et de minimiser les effets d'inhibition de la première PCR.

Néanmoins, les *risques de contamination* entre échantillons sont tels avec cette technique qu'elle est quasi inutilisable en routine !

- la PCR en temps réel :

La PCR en temps réel (*Real-time PCR*) est une révolution dans l'utilisation de la PCR. Elle combine les phases d'amplification et de détection des produits de PCR, ce qui raccourcit la durée de la réaction à moins de 4h.

Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent.

◆ Principe :

(Maubon, Brenier-Pinchart et coll. 2007)

Une molécule fluorescente est introduite dans le mélange réactionnel, ce qui permet la détection d'ADN par fluorimétrie. La détection en temps réel des amplicons se fait soit grâce à un agent intercalant de l'ADN, le SYBR Green I, soit grâce à des sondes fluorescentes spécifiques de la séquence cible.

La méthode **SYBR Green** I est simple, sensible, mais sa spécificité est largement conditionnée par le choix des amorces. En effet, toutes les molécules d'ADN double-brin, spécifiques ou non, et les dimères d'amorces, seront détectés par cette technologie.

Le principe du **FRET** (*fluorescence resonance energy transfer*) présente une grande spécificité puisqu'il utilise des sondes marquées, complémentaires de la séquence à amplifier. Le transfert d'énergie se fait entre deux fluorophores, un donneur et un accepteur. Le second fluorophore (dit bloqueur ou *quencher*) absorbe l'énergie émise par le premier (dit donneur ou *reporter*) et empêche ainsi l'émission de fluorescence lorsque la sonde se trouve libre dans le milieu réactionnel ou fixée à l'ADN cible sous sa forme native. Ce processus d'extinction est possible grâce au *transfert d'énergie par résonance de fluorescence ou FRET* (Glazer and Mathies 1997).

La technologie FRET se base sur un transfert d'énergie depuis le reporter (haute énergie) vers le quencher (faible énergie). Le reporter n'émet pas de fluorescence quand la sonde est intacte, donc lorsque reporter et quencher sont proches. Au cours de l'élongation, catalysée par la Taq Polymérase, l'activité 5' nucléase de la polymérase déplace la sonde et détache le fluorochrome ou *reporter*. Lorsque la polymérisation est complétée, pour chaque molécule d'ADN synthétisée, le *reporter* émet de la fluorescence. L'intensité de la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la PCR.

Ces 2 fluorophores peuvent être situés sur deux sondes différentes (sonde FRET en tandem), choisies pour s'hybrider spécifiquement à la séquence d'intérêt à quelques bases d'intervalle. En l'absence de la séquence cible, cette hybridation n'a pas lieu et aucun signal n'est détecté. Cette technologie est celle du LightCycler® (Roche Diagnostics).

Les 2 fluorophores peuvent aussi être situés sur une seule et même sonde, comme dans le cas de la sonde TaqMan® (Applied Biosystems). Dans ce système, l'hydrolyse de la sonde par

l'ADN polymérase permet l'éloignement des fluorophores et la fluorescence émise par le donneur seul peut alors être détectée.

La sonde Beacon[®] elle aussi est marquée à ses deux extrémités, sous une configuration tige-boucle, dans laquelle la boucle est complémentaire de la séquence cible. Lorsque la sonde s'hybride, l'éloignement des deux fluorochromes permet l'émission et la détection de la fluorescence émise par le donneur.

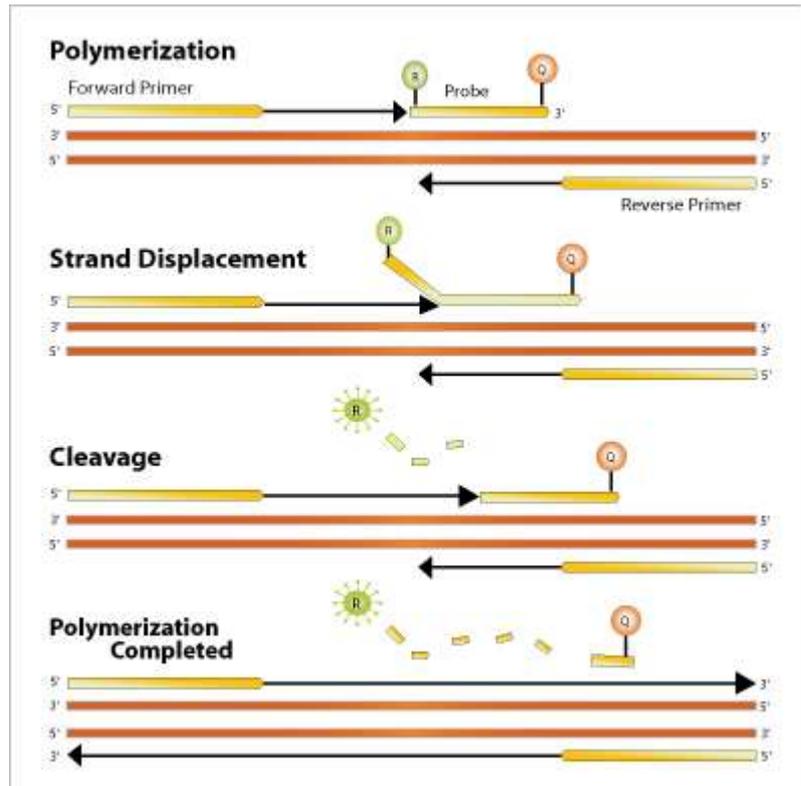


Figure 13 : Principe de la PCR en temps réel utilisant la méthode TaqMan[®]

(issu de : www.bio.davidson.edu/.../Pierce/realtimemcr.htm.)

Cette technique tend à se développer de plus en plus, de par ses très bons résultats. Dans l'étude de Lin, la méthode de PCR en temps réel se révèle très sensible (détection de 0,05 tachyzoïtes dans l'échantillon), très reproductible (coefficient de variation de 0,4%), rapide (environ 2h30 pour traiter 10 échantillons, *versus* 6h pour la nested-PCR) et permettant la quantification des parasites. Les auteurs recommandent l'adaptation de cette méthode en routine, en complément des autres techniques (Lin, Chen et coll. 2000).

De même, dans son étude publiée en 2003, Bretagne déplore la grande variabilité des résultats obtenus par la PCR « classique » et tente de l'expliquer par différentes raisons : la variabilité

des cibles choisies et des primers utilisés, la multiplication de techniques « maison » n'utilisant pas toujours de contrôle interne, l'extraction pas toujours optimale, la contamination entre tubes (surtout avec la nested-PCR).

La PCR en temps-réel pourrait supprimer certains de ces problèmes ; elle combine les étapes d'amplification et de quantification des acides nucléiques, bénéficie d'une extraction automatique (MagNa Pure de Roche) et semble très rapide (environ 2 heures) (Bretagne 2003).

Au début des années 2000, la PCR est devenue un des outils essentiels au diagnostic de la toxoplasmose, congénitale et disséminée, mais le manque de standardisation et l'intérêt bioclinique de la quantification vont amener plusieurs équipes à se tourner vers une nouvelle technologie. C'est dans ce contexte que sont apparus les premiers protocoles de **PCR quantitative en temps réel** dans le diagnostic de la toxoplasmose.

- la PCR quantitative en temps réel :

La quantité d'ADN présent dans un échantillon biologique est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage préalablement établie. Des dilutions sérielles d'un échantillon standard titré en nombre de copies de gènes sont effectuées puis soumises au protocole de PCR quantitative pour établir le cycle seuil (Ct pour threshold cycle), correspondant à cette quantité d'ADN connue. Le cycle seuil correspond au nombre de cycles nécessaires pour détecter une fluorescence significativement différente du bruit de fond : il est inversement proportionnel au logarithme du nombre de molécules de l'ADN cible, initialement présentes dans l'échantillon. Une fois établie, cette droite d'étalonnage permet par extrapolation de déterminer la quantité d'ADN présente dans l'échantillon testé (figure 14).

En plus de permettre la quantification de la charge en ADN, cette technique offre plusieurs avantages :

- une fois l'amplification terminée, il n'est pas nécessaire de procéder à des manipulations supplémentaires pour mettre en évidence les amplicons ; cela limite donc de façon non négligeable le risque de contamination « tube à tube » qui existe avec la PCR qualitative.
- parallèlement, la spécificité est aussi améliorée par la présence de sondes complémentaires de la séquence cible, réduisant le risque d'amplification non spécifique.

- l'utilisation systématique d'un contrôle interne a aussi été facilitée puisque les constructeurs proposent ce contrôle parallèlement à l'utilisation de leur kit de PCR quantitative.

Cette PCR quantitative devrait permettre d'obtenir des résultats plus harmonieux entre les équipes tout en offrant un gain de temps non négligeable dans le rendu des résultats.

Ces constatations ont amené plusieurs équipes à élaborer et évaluer des protocoles de PCR quantitative pour *T.gondii* (figure 14).

Les gènes d'intérêt sont identiques à ceux utilisés pour la PCR qualitative, c'est-à-dire B1, séquence 529 bp, voire P30 et ADNr18s.

Le plus souvent, les protocoles utilisent le système de quantification par FRET et la gamme d'étalonnage est établie par dilution d'ADN extrait de souches de référence.

Pourtant, il existe une grande hétérogénéité pour l'extraction ainsi que pour l'utilisation de contrôle interne, pas encore systématisée.

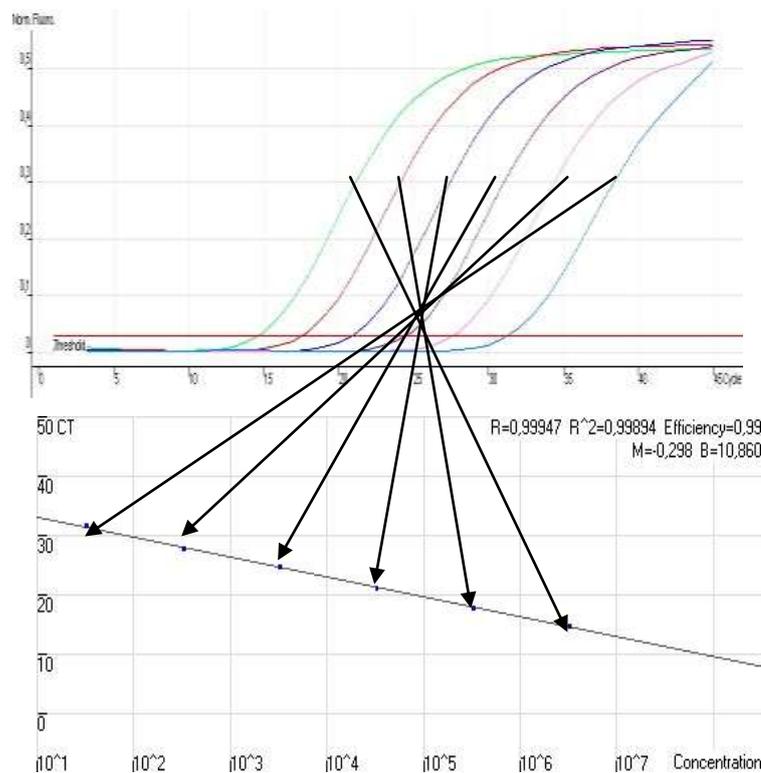


Figure 14 : Courbes de résultats de PCR quantitative en temps réel.

Etude bibliographique : toxoplasme et toxoplasmose

Auteurs	Gène amplifié	Contrôle interne	Technique de détection appareil	Etablissement de la gamme	Quantification	Technique d'extraction	Echantillons biologiques
Costa et coll; 2000	Gène B1	Oui (gène murin)	Sondes FRET en tandem/LightCycler	Dilution de l'ADN	0,75 à 7,5.10 ⁵ toxoplasmes/10µL	Méthode classique	Sérum et LA
Lin et coll., 2000	Gène B1(amorces ToxoR/ToxoF)	Non	Sonde FRET Taqman	Dilution de l'ADN	0,05 à 5000 toxo/10µL	Méthode rapide	Coupes de tissus fœtaux
Romand et coll., 2004	Gène B1(amorces B22/B23)	Non	SYBR Green I LightCycler	Dilution d'un plasmide liquide amniotique	?	QIAamp DNA mini kit (Qiagen)	LA
Contini et coll.,2005	B1 (B22-B23), SAG4,MAG1	Non	SYBR Green I LightCycler	Dilution d'un plasmide	?	Phénol-Chloroforme	Sérums et Globules blancs de patients suspects de chorioretinite
Reischl et coll.,2003	Gène 529 bp	Oui (gène β actine)	Sondes FRET en tandem/LightCycler	Dilution de l'ADN	0,25 à 2,5.10 ⁴ toxo/5µL	High Pure Template Preparation Kit (Roche)	LA
Cassaing et coll.,2005	Gène 529 (nouvelles amorces) versus B1	Oui (β globuline humaine)	Sondes FRET en tandem/LightCycler	Dilution de l'ADN	/	Variable en fonction de l'échantillon	Variés
Edvinson et coll.,2006	Gène 529 (nouvelles amorces) versus B1	Oui (compétitif)	SYBR Green I LightCycler (B1 versus 529bp) et Sonde FRET Taqman (529bp)	Dilution de l'ADN	B1 : 10 eq génome 529 bp : 1 eq génome	MagNa Pure LC extraction (Roche)	Sang patients transplantés
Buchbinder et coll.,2003	Gène de la protéine P30 versus B1	Non	Sondes FRET en tandem/LightCycler	Dilution de l'ADN	10 à 10 ⁵ toxo/2µL	QIAamp DNA mini kit (Qiagen)	Sérum
Kupferschmidt et coll., 2001	Gène codant pour la S.U 18S de l'ARNr	Non	Sonde FRET Taqman	Dilution des toxoplasmes dans sang, LCR et LA	10 à 10000/mL	QIAamp blood mini kit (Qiagen)	Sang
Jauregui et coll.,2001	Gène codant pour la S.U 18S de l'ARNr(amorces ITS1)	Oui (gène murin)	Sonde FRET Taqman	Dilution de l'ADN	1 à 10 ⁵ toxo/25µL	Méthode classique	Tissus porc et souris

Figure 15 : Récapitulatif des différents protocoles de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de l'ADN de *T.gondii*. (Maubon, Brenier-Pinchart et coll. 2007)

La PCR quantitative pour la toxoplasmose pourrait avoir diverses applications : plusieurs études ont déjà montré une corrélation entre la charge parasitaire et l'évolution clinique des patients immunodéprimés sous traitement (contexte de toxoplasmose disséminée).

Dans la toxoplasmose congénitale, les résultats sont moins nets et doivent encore être étayés par d'autres études, mais un **lien entre la gravité des lésions fœtales et la charge parasitaire du liquide amniotique** semble exister.

Ainsi, dans l'étude de Costa en 2001, la technique de PCR temps réel (Duplex LightCycler PCR) est utilisée sur 87 liquides amniotiques. Un contrôle interne est fait en parallèle. La charge parasitaire est rendue $\geq 10^3$, entre 10^2 et 10^3 , entre 10 et 10^2 et ≤ 10 parasites/mL de liquide amniotique. Les 2/3 des patientes ayant des anomalies échographiques ont une charge $\geq 10^3$. Les patientes ayant fait une séroconversion au 3^{ème} trimestre n'ont pas d'anomalies échographiques dans cette étude et aucune n'a de charge parasitaire $\geq 10^3$. Ainsi, la tendance serait d'associer une charge parasitaire élevée avec les anomalies échographiques traduisant les lésions fœtales, surtout en cas d'infection précoce pendant la grossesse (Costa, Ernault et coll. 2001).

Plus récemment, l'étude de Romand de 2004 confirme ce lien entre concentration parasitaire dans le liquide amniotique et gravité des lésions fœtales, d'où un intérêt de la PCR quantitative sur le LA comme **marqueur pronostique de l'infection fœtale**. En outre, une corrélation est démontrée entre concentration de tachyzoïtes dans le LA et âge gestationnel lors de la séroconversion, les concentrations parasitaires les plus importantes se retrouvant pour des séroconversions précoces, <20SA, comme l'illustre la figure suivante.

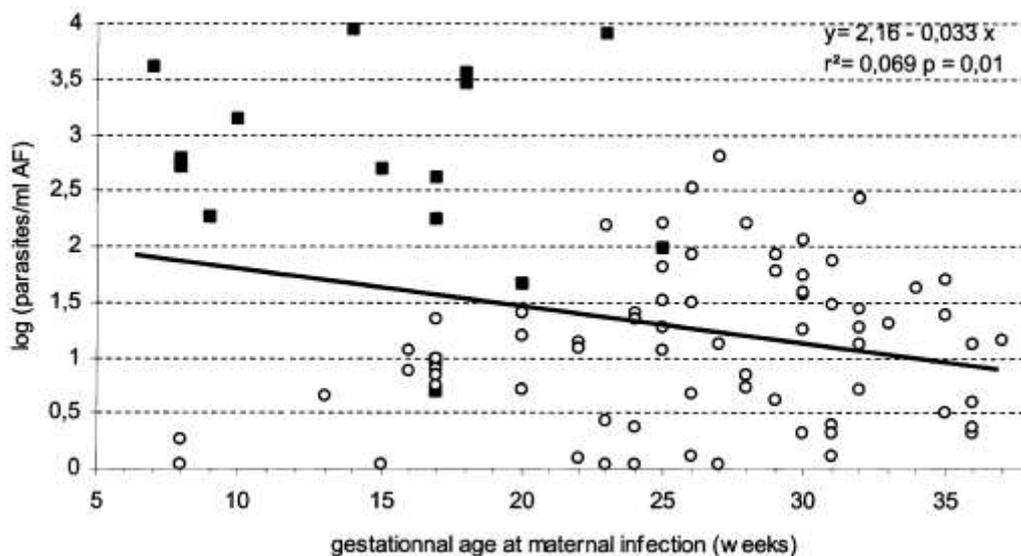


Figure 16 : Répartition des infections congénitales selon leur gravité en fonction de la concentration de toxoplasmes dans le liquide amniotique et de l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle

(■ représentant une infection sévère chez l'enfant et ○ une infection sans signe clinique ou très modérée)(Romand, Chosson et coll. 2004).

Au final, les auteurs soulignent **2 paramètres associés à une infection sévère :**

- une *séroconversion précoce* pendant la grossesse.
- une *concentration parasitaire élevée dans le LA*.

La figure ci-dessous illustre bien le fait que les lésions fœtales les plus graves sont observées pour des séroconversions maternelles < 20 SA le plus souvent. Ainsi, dans cette étude de 2004, Romand rapporte 88 cas d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale, l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle étant < 20 SA pour 26 enfants, ≥ 20 SA pour 62. Tous les avortements spontanés se sont produits en début de grossesse, soit pour des séroconversions précoces.

Sur les 26 séroconversions < 20 SA, 15 grossesses se sont arrêtées (5 spontanément, 10 par IMG). Sur les 11 enfants nés, 1 a développé une dilatation ventriculaire, 4 des calcifications cérébrales et seulement 6 avaient une atteinte infra-clinique.

Tableau 3 : évolution clinique des 88 fœtus ayant eu une PCR du LA positive, en regard de l'âge gestationnel lors de l'infection maternelle (Romand, Chosson et coll. 2004).

Age gestationnel lors de la séroconversion	total	Nombre de nouveau-nés et leur état clinique				Nombre de arrêtées grossesses	
		Infection infra-clinique	Calcification cérébrale	choriorétinite	Dilatation ventriculaire	Mort foetale	IMG
< 20 SA	26	6	4		1	5	10
≥ 20 SA	62	52	6	1	1		2
total	88	58	10	1	2	5	12

Pour conclure sur les résultats du *diagnostic prénatal par analyse du liquide amniotique*, par PCR et inoculation aux souris, reprenons les résultats de différentes études publiées récemment.

✘ Sensibilité des techniques :

La sensibilité de la PCR est toujours obtenue supérieure à celle de l'inoculation aux souris.

Elle est de **81%** dans l'étude de Foulon en 1999, **64%** dans celle de Romand en 2001, **90%** dans celle de Bessières en 2002 (contre 70% pour les souris), **83%** dans celle de Antsaklis en 2002 (contre 61% pour les souris) et **93%** dans l'étude de Bastien de 2006 recensant les résultats de 3 ans de contrôles de qualité externes envoyés à 23 laboratoires français.

Néanmoins, tous les auteurs soulignent l'importance de ***combiner les 2 techniques, de PCR et d'inoculation aux souris du LA, pour augmenter la sensibilité du diagnostic prénatal*** : elle passerait ainsi à **93%** (Bessières et coll. 2002), **94%** (Antsaklis, Daskalakis et coll. 2002).

Notons enfin que l'apport de la PCR pour le diagnostic d'atteinte congénitale varie en fonction du terme de la grossesse : elle est bien plus contributive dans les 2 premiers trimestres que dans le dernier.

Par exemple, d'après la figure ci-dessous, pour une séroconversion à 12 SA, une PCR positive augmente de beaucoup la probabilité d'avoir un fœtus infecté, passant de 9% à 84% ! Au contraire pour une séroconversion à 36 SA, une PCR positive augmente la probabilité pour le bébé de 73 à 99% ce qui est important mais moins significatif qu'à 12SA.

La courbe de probabilité d'atteinte fœtale « de base » (trait continu sur le graphique) devient celle du haut en cas de PCR positive (forte majoration du risque), et celle du bas en cas de PCR négative (petite baisse du risque). La PCR a en effet une très forte VPP mais une VPN moins importante, et qui de toute façon ne permet en aucun cas d'exclure une atteinte de l'enfant.

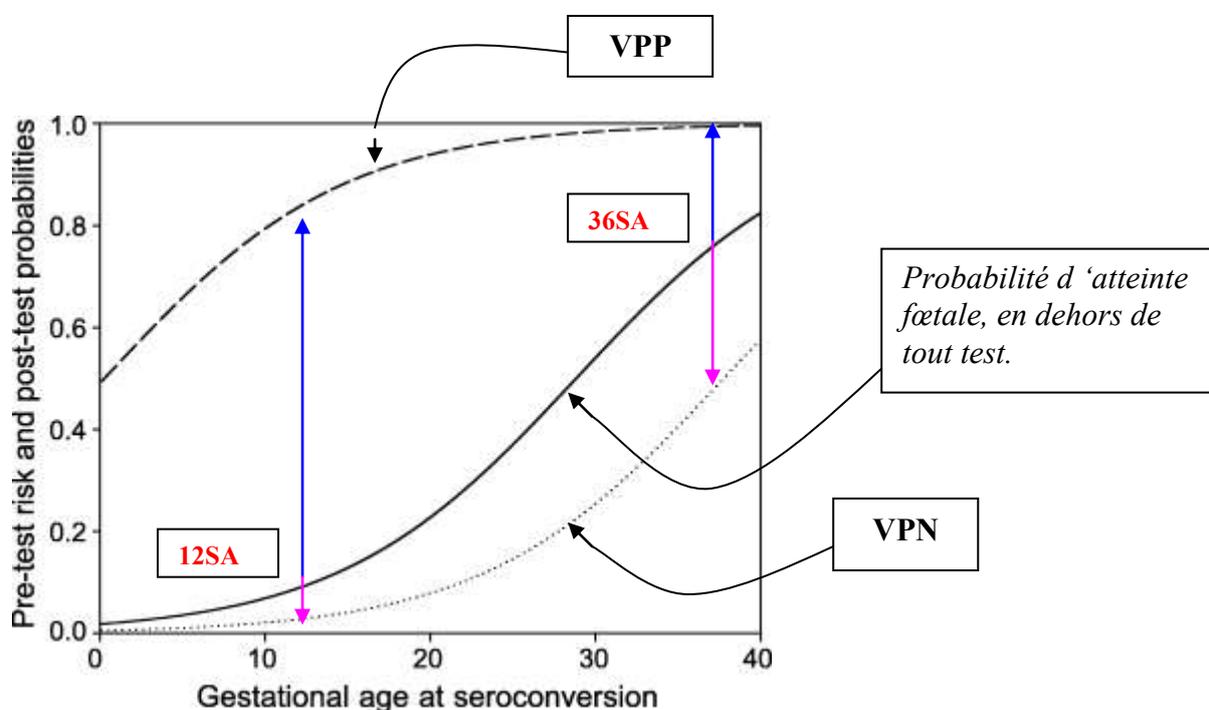


Figure 17 : Probabilité d'avoir un enfant atteint de TC

en l'absence de tout test(—), en cas de PCR du LA positive (---) et négative (...):d'après (Thalib, Gras et coll. 2005)

Le problème des faux-négatifs avec cette technique existe (jusqu'à 20%), même s'il est moins important qu'avec toutes les autres techniques.

Plusieurs explications sont avancées pour tenter de comprendre la raison de ces faux-négatifs : la présence fugitive ou intermittente du parasite dans le liquide amniotique ou une très faible

concentration parasitaire au moment de l'amniocentèse (or la PCR a une limite de détection variable selon les techniques, mais souvent relevée à 3 parasites/mL) (Bastien 2002).

➡ Il est important de retenir **qu'une amniocentèse revenue négative par PCR et/ou inoculation aux souris n'exclut en rien une infection congénitale. Le diagnostic néonatal chez la maman et l'enfant est indispensable, ainsi que le suivi sérologique du bébé pendant au moins 1 an.**

✦ Spécificité :

La spécificité de la PCR est excellente, en général obtenue à 100% (Robert-Gangneux, Gavinet et coll. 1999; Romand, Wallon et coll. 2001; Antsaklis, Daskalakis et coll. 2002), voire à peine plus faible : 96% (Foulon, Pinon et coll. 1999), 97,3% (Bastien, Jumas-Bilak et coll. 2007), 95% (Kaiser, Van Loon et coll. 2007).

Une amniocentèse positive est donc très fortement évocatrice d'infection congénitale, mais il est important de toujours avoir à l'esprit qu'il existe de rares cas de faux positifs, d'où l'importance du diagnostic néonatal et du suivi sérologique de l'enfant, une nouvelle fois.

Tableau 4 : revue de plusieurs études rapportant les résultats de la PCR sur le LA.

Auteurs et année de publication	Nombre d'enfants	Toxoplasmose congénitale		Non infectés	
		PCR+	PCR-	PCR+	PCR-
Grover et coll., 1990	43	7	2	0	34
Dupouy-Camet et coll., 1992	44	7	3	2	32
Cazenave et coll., 1992	80	10	0	0	70
Hohlfeld et coll., 1994	339	37	1	0	301
Jenum et coll., 1998	102	10	7	5	80
Gratzl et coll., 1998	49	11	0	0	38
Foulon et coll., 1999	46	20	2	3	21
Robert-Gangneux et coll., 1999	94	16	5	0	73
Romand et coll., 2001	270	48	27	0	195
Bessieres et coll., 2002	148	56	4	0	88
Antsaklis et coll., 2002	79	10	2	0	67

La PCR sur le LA est donc une technique sensible et très spécifique qui représente un bénéfice considérable pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose.
Elle reste toujours à associer à la technique d'origine, d'inoculation aux souris pour optimiser les résultats.

2.2. Suivi échographique

La surveillance échographique mensuelle dans un centre spécialisé est indispensable. Elle permet de dépister les atteintes organiques fœtales, voire d'établir dans certains cas un pronostic (Jacquemard 2003).

Plusieurs signes échographiques sont à rechercher :

➔ Atteinte cérébrale :

Les lésions les plus fréquemment observées à l'échographie sont cérébrales, surtout en cas de contamination précoce (<20SA).

Plusieurs types de lésions sont visibles :

- les *dilatations ventriculaires*, habituellement bilatérales et symétriques. C'est l'atteinte cérébrale la plus fréquente, d'évolution souvent rapide (en quelques jours), avec un impact pronostic important quant à la poursuite ou non de la grossesse (Hohlfeld, MacAleese et coll. 1991). Cette étude rapporte 32 cas de signes échographiques parmi 81 fœtus atteints, les plus fréquents étant la dilatation ventriculaire, évoluant souvent en quelques jours. Pour plus d'un tiers des fœtus plus de 2 atteintes échographiques étaient visualisées. Les auteurs soulignent ici la valeur pronostique importante en cas d'atteinte cérébrale sévère, mais aussi les limites de la technique pour déceler les nécroses cérébrales sans dilatation ventriculaire.

- les calcifications intracrâniennes, stigmates cicatriciels de la nécrose.

Elles se présentent comme des zones hyperéchogènes, de détection parfois délicate à l'échographie.

➔ Atteinte des autres organes :

▪ Une hépatomégalie, isolée ou non, peut se voir et se traduit par une augmentation du périmètre abdominal.

▪ Le placenta, siège d'une placentite, est souvent d'épaisseur augmentée. Il peut présenter des zones d'hyperdensité.

▪ Il peut également être constaté un épanchement pleural ou péricardique, une ascite.

▪ La toxoplasmose congénitale peut aussi entraîner des retards de croissance ou une inflexion de croissance lors d'examen successifs.

▪ A l'heure actuelle, aucune technique d'imagerie fœtale ne permet d'évaluer l'atteinte rétinienne. Le pronostic visuel des enfants est difficile à établir (Daffos, Forestier et coll. 1988).

Dans l'étude de Abboud de 1995, sur 2168 séroconversions maternelles on dénombrait 168 fœtus atteints et parmi eux, 48 cas d'anomalies détectées à l'échographique (soit 28 % parmi

les fœtus contaminés). Les lésions étaient multiples dans 44 % des cas, on notait des calcifications cérébrales dans 40 % des atteintes et une hépatomégalie isolée chez 4 fœtus. Une IMG a été pratiquée pour 51 % de ces grossesses avec anomalie échographique.

☛ Pour les auteurs, l'échographie est une technique fiable mais détectant malheureusement trop tard des lésions irréversibles. Elle peut aider à la décision d'IMG ou non (Abboud, Harika et coll. 1995).

La surveillance échographique mensuelle est indispensable en cas de séroconversion maternelle. Elle apporte des précisions quant au pronostic de l'enfant (excepté le pronostic visuel malheureusement) et peut aider à la décision d'interruption médicale de grossesse si nécessaire.

2.3. Interprétation des résultats

Le diagnostic prénatal est considéré **positif** si :

- l'échographie permet de mettre en évidence une ou des anomalie(s) morphologique(s).
- et/ou le diagnostic biologique prénatal pratiqué sur le LA détecte la présence de *T.gondii*.

◆ En cas de diagnostic prénatal positif pour la recherche de parasites dans le LA, il convient de modifier de le traitement de la mère en remplaçant la rovamycine[®] par l'association pyriméthamine (Malocide[®], 50 mg/j) + sulfadiazine (Adiazine[®], 3g/j) en cure discontinue. Une supplémentation en acide folinique (Lederfoline[®], 50 mg deux fois par semaine). Du fait de la toxicité hématologique de la pyriméthamine (effet anti-folique), il convient de surveiller chaque semaine la numération formule sanguine (risque d'anémie mégaloblastique, thrombopénie et surtout neutropénie).

Quelques effets indésirables à type de toxidermie peuvent se voir (syndrome de Lyell...), en lien avec les sulfamides.

L'association pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar[®]) est moins utilisée.

◆ La valeur prédictive négative d'une analyse par PCR du liquide amniotique n'étant pas de 100 %, le maintien d'une prophylaxie par Rovamycine[®] est impérative jusqu'à l'accouchement même si le résultat du diagnostic anténatal est négatif (Romand, 1998).

Le traitement par la spiramycine est remplacé par l'association pyriméthamine + sulfadiazine en cas de diagnostic antenatal positif (échographie anormale et/ou diagnostic biologique pratiqué sur le LA positif).

3. Diagnostic néonatal

La prise en charge du nouveau-né est capitale et doit être *systematique suite à la séroconversion maternelle*, pergravidique ou survenue dans les semaines ayant précédé la conception (surtout en cas de signes cliniques chez la mère où le risque de transmission au fœtus est majoré), quel que soit le résultat du diagnostic prénatal.

En effet, en dépit des progrès réalisés dans ce domaine, une amniocentèse réalisée trop rapidement après la séroconversion peut être faussement négative en raison du délai de transmission à travers le placenta, délai d'autant plus long que la séroconversion est survenue précocement au cours de la grossesse (Morin 2002).

De plus, celui-ci n'étant en général pas pratiqué en cas de séroconversion de fin de grossesse, le bilan à la naissance de l'enfant est fondamental pour affirmer ou non une atteinte toxoplasmique, d'autant plus que le risque d'infection fœtale est maximal en fin de grossesse [environ 90% de transmission dans les 2-3 dernières semaines (Couvreur 1999)].

3.1. Bilan clinique

Il est pratiqué dans les jours suivant la naissance et vise à rechercher des signes non spécifiques d'embryofoetopathie (hépatomégalie, splénomégalie, ictère, purpura thrombopénique, anémie...) ou séquellaires (convulsions, microcéphalie).

Un examen neurologique complet est pratiqué dans les premiers jours de vie de l'enfant.

En pratique, il est le plus souvent normal, les formes graves étant exceptionnelles en France grâce au dépistage prénatal mensuel obligatoire.

L'étude de Couvreur en 1999 rapporte 5% de formes sévères à la naissance, contre 71% de formes infracliniques (Couvreur 1999).

En revanche, l'étude de Foulon en 1999 notait la présence de formes graves chez une proportion plus importante de nouveaux-nés, soit jusqu'à 20%, mais alors que la mère n'avait reçu aucun traitement pendant sa grossesse (Foulon, Villena et coll. 1999).

Un examen du fond d'œil de l'enfant est également fait de façon systématique que la séroconversion soit certaine ou fortement suspectée à la recherche de lésions de chorioretinite (Ferret, Marty et coll. 2003).

La fréquence des atteintes oculaires à type de chorioretinite varie de 3 à 13% à la naissance, pour atteindre 20 à 30% chez les enfants suivis à plus long terme (Peyron, Wallon et coll. 1996).

De même, Schmidt en 2006, dans son étude sur 4 ans de dépistage de tous les nouveaux-nés au Danemark à partir de leurs prélèvements pour le test de Guthrie, rapporte une prévalence de 2,1 enfants atteints de toxoplasmose congénitale pour 10 000 naissances, et parmi ceux-ci des lésions de chorioretinite chez 9,6% d'entre eux à la naissance, et chez 15,6% à 3 ans (Schmidt, Høgh et coll. 2006).

Les lésions maculaires qui engagent le pronostic visuel de la toxoplasmose congénitale sont présentes dans 2 à 8% des cas (Peyron, Wallon et coll. 1996).

Ces chiffres soulignent l'importance du suivi ophtalmologique des enfants au moins jusqu'à la puberté, période de recrudescence des lésions de chorioretinite diagnostiquées (Couvreur 1993).

Le suivi clinique des enfants atteints de toxoplasmose congénitale est indispensable au long cours car la majorité des formes sont infra-cliniques à la naissance. Les atteintes les plus fréquentes sont visuelles et de révélation tardive le plus souvent, ce qui impose un suivi ophtalmologique au minimum jusqu'à la puberté.

3.2. Bilan paraclinique : imagerie

Il permet de mettre en évidence les anomalies cérébrales méconnues pendant la grossesse ou d'apparition plus tardive (une hydrocéphalie pouvant se constituer en quelques jours), par échographie transfontanellaire. A l'heure actuelle, moins de 1% des enfants atteints de toxoplasmose congénitale présentent une hydrocéphalie (Ferret, Marty et coll. 2003).

Une radiographie du crâne est également faite à la recherche de calcifications intracrâniennes, périventriculaires ou intraparenchymateuses. A la naissance, 5 à 10% des enfants présentent de telles calcifications (Schmidt, Hogh et coll. 2006). La radiographie nécessite éventuellement un scanner complémentaire lorsque les calcifications sont nombreuses, de grande taille, ou associées à des kystes cérébraux (Kieffer, Thulliez et coll. 2002).

Un scanner cérébral sera également entrepris dans le cas de chorioretinite.

Une ponction lombaire enfin est réalisée à J2-J3 seulement si chorioretinite ou calcifications cérébrales pour une recherche d'hyperprotéinorachie (Réseau 2006).

3.3. Bilan parasitologique

Le diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale en période néonatale repose sur deux stratégies : la mise en évidence du parasite dans le placenta ou le sang de cordon et la recherche chez l'enfant d'anticorps néosynthétisés susceptibles de traduire une atteinte congénitale.

*Ce bilan néonatal est considéré **positif** lorsque l'un ou plusieurs des critères suivants sont remplis :*

- ◆ *inoculation à la souris du placenta et/ou du sang de cordon positive.*
- ◆ *détection d'IgM et/ou d'IgA spécifiques dans le sang de cordon, vérifiée à J8-J10.*
- ◆ *profils comparés IgG et/ou IgM positifs.*

(Bessieres, Berrebi et coll. 2001; Morin 2002)

3.3.1 : *Diagnostic direct : placenta, sang de cordon*

❖ Inoculation à la souris :

➤ **Le placenta** (200g minimum) est prélevé le plus aseptiquement possible et placé dans un flacon stérile, sans conservateur, stocké à +4°C, adressé au laboratoire dans les meilleurs délais (<24 h). Il est ensuite préparé de manière à être inoculé à 10 souris femelles par voie intra-péritonéale (Desmonts et Couvreur, 1974).

➤ **Le sang du cordon** est placé dans un tube sec (5-10 mL) pour l'isolement des parasites et les tests sérologiques.

Le caillot du sang de cordon une fois broyé ou liquéfié est également inoculé par voie intra-péritonéale à un lot de 6 souris si possible, à raison de 1mL/souris.

↳ Les souris ainsi inoculées sont prélevées au niveau de la veine caudale après un délai de 3 et 6 semaines. La recherche d'IgG spécifiques sera effectuée, par technique d'agglutination selon les recommandations de Desmonts en 1974. Les souris dont la sérologie est positive sont sacrifiées pour la recherche de kystes de toxoplasmes dans le cerveau. Si cette recherche est négative, de nouvelles souris sont inoculées par voie intra-péritonéale avec un broyat du cerveau des souris positives en sérologie. Cette mise en évidence de kystes de toxoplasme au microscope est **indispensable** au diagnostic.

- Cette technique d'inoculation du **placenta** aux souris a une *excellente spécificité*, jusqu'à 100 % (Naessens, Jennum et coll. 1999; Robert-Gangneux, Gavinet et coll. 1999; Morin 2002). Pourtant de rares cas de « faux-positifs » ont été rapportés, mais nuancés par les auteurs : ainsi Fricker-Hidalgo en 1998 penchait plus vers une vraie colonisation placentaire mais sans atteinte du bébé (notion de « délai placentaire »), ou vers une vraie atteinte de l'enfant non mise en évidence par les techniques sérologiques du fait d'Ig négatives à la naissance, dues au traitement précoce.

- Sa *sensibilité* est variable selon les études : de 45 % (Naessens, Jenum et coll. 1999), 51 % (Fricker-Hidalgo, Pelloux et coll. 1998; Bessieres, Berrebi et coll. 2001), jusqu'à 94 % dans une seule étude (Morin 2002).
- Pour ce qui est de l'inoculation du **sang de cordon**, elle montre une *sensibilité* inférieure : 16 % seulement selon Naessens en 1999 (Naessens, Jenum et coll. 1999), 43 % selon Bessières (Bessieres, Berrebi et coll. 2001) et jusqu'à 61 % selon Morin (Morin 2002).

Sa *spécificité* est excellente et un résultat positif d'inoculation de sang de cordon constitue une preuve irréfutable d'atteinte du nouveau-né. Ponctuellement, il a même été rapporté par certains auteurs la possibilité d'inoculation placentaire négative mais d'inoculation de sang de cordon positive, justifiant la pratique de cette dernière (Bessieres, Berrebi et coll. 2001).

◀ Combiner les 2 prélèvements (placenta + sang de cordon) pour l'inoculation aux souris a démontré un intérêt certain, ce qui justifie de le réaliser dans la mesure du possible.

❖ PCR:

Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées pour l'analyse du placenta (voire du sang de cordon, mais bien moins documenté et pratiqué) à la recherche d'ADN parasitaire. Aucune étude à vaste échelle n'a encore été entreprise à notre connaissance. Dans les premiers travaux, le but était d'étudier l'intérêt de la recherche d'ADN toxoplasmique dans le placenta, en l'absence de diagnostic prénatal positif, et de comparer les résultats à ceux des techniques sérologiques réalisées à la naissance (Fricker-Hidalgo 2005).

Les arguments de facilité d'obtention du placenta et de possibilité de diagnostic néonatal plus rapide par PCR (par rapport aux souris en particulier) et donc de mise sous traitement de l'enfant plus rapidement étaient avancés pour introduire la nécessité de développer la technique de PCR. En effet, en maximum 48 heures, la PCR est à même de rendre un résultat de détection d'ADN toxoplasmique dans le placenta.

Les techniques manquent encore d'harmonisation entre laboratoires.

Elles sont basées sur celles utilisées pour le liquide amniotique.

La cible choisie est le plus souvent le **gène B1** et une technique de **PCR en temps réel** est ensuite employée, utilisant un contrôle interne de manière systématique (Guy, Pelloux et coll. 1996; Pelloux, Weiss et coll. 1996).

- La PCR apporte un gain de sensibilité indéniable par rapport à l'inoculation à l'animal : elle est de 60,9 % dans l'étude de Fricker-Hidalgo en 1998, ce qui est supérieure aux sensibilités des autres techniques rapportées dans l'étude : 51 % pour l'inoculation aux souris et 29 % pour les cultures cellulaires. Dans 3 cas d'atteinte congénitale sur 33, la PCR s'est même révélée être la seule technique positive (souris et culture cellulaire négatives) (Fricker-Hidalgo, Pelloux et coll. 1998).

Les cas de résultats faussement négatifs en PCR pourraient s'expliquer par une prise d'essai trop faible (200 g prélevés en divers endroits de l'organe) ou par un problème d'extraction, sachant que celle-ci est plus délicate lorsqu'elle est pratiquée sur des tissus que sur des liquides comme le liquide amniotique.

- La *spécificité* de la méthode est assez bonne [91,8% dans l'étude pré-citée, 94 % ultérieurement (Fricker-Hidalgo 2005)] mais souffre néanmoins d'un nombre non négligeable de faux-positifs. Ils pourraient s'expliquer soit par une contamination de laboratoire ou par la détection de toxoplasmes altérés par le traitement antiparasitaire et donc incapables d'infecter les fœtus (comme les souris d'ailleurs), ce qui équivaut à une vraie placentite, mais sans contamination de l'enfant.

La PCR reste encore une technique de réalisation délicate, réservée à quelques laboratoires expérimentés. De plus, l'inoculation à l'animal permet de conserver les souches, à but épidémiologique.

Il faut retenir le fait que combiner les techniques d'inoculation à la souris et de biologie moléculaire apporte un gain de sensibilité non négligeable (Fricker-Hidalgo, Pelloux et coll. 1998) et pourrait atteindre une sensibilité de 75 % d'après Bastien (Bastien 2002), et jusqu'à 80% d'après les résultats d'une équipe de Montpellier (Albert, données non publiées, 2004).

Les premiers résultats des publications montrent tous l'intérêt de **COMBINER inoculation aux souris et PCR** pour l'analyse du placenta et ne parlent pas pour le moment de la

possibilité de substituer l'inoculation par la PCR . Cette comparaison des 2 techniques (PCR et inoculation) fait l'objet de ce travail de thèse, qui a pour objectif de voir les éventuels bénéfices de la biologie moléculaire par rapport à la technique de référence, l'inoculation aux souris.

Le diagnostic néonatal parasitologique direct repose sur l'analyse du placenta, voire du sang de cordon.
L'analyse du placenta s'est faite par inoculation aux souris jusqu'alors. La PCR est une technique complémentaire prometteuse, plus sensible et plus rapide, mais moins spécifique, donc restant à combiner avec l'inoculation aux souris.

3.3.2. Diagnostic indirect : bilan sérologique

Le diagnostic immunologique a pour but de détecter la synthèse d'anticorps chez l'enfant, et de les différencier clairement des Ac maternels transmis passivement.

❖ Mise en évidence d'IgM ou d'IgA :

Ces isotypes ne franchissent pas la barrière placentaire, leur présence dans le sang de l'enfant fait donc suspecter une synthèse par le nouveau-né et donc l'atteinte congénitale (Bessieres, Roques et coll. 1992).

Toutefois, ce résultat doit être confirmé vers le dixième jour de vie car une effraction placentaire a pu se produire lors de l'accouchement.

Dans ce cas, l'ensemble des Ac maternels est transmis à l'enfant. Il faut alors attendre l'élimination de ces Ac transmis avant de faire un nouveau prélèvement.

La détection de ces Ac peut se faire par différentes techniques : ELISA (IgA), Immunocapture (ISAGA pour les IgM).

La *sensibilité* de détection varie selon les techniques employées (Pinon, Dumon et coll. 2001).

Elle dépend aussi de la *date de contamination maternelle* (Naessens, Jenum et coll. 1999; Bessieres, Berrebi et coll. 2001). Dans les séroconversions tardives, le délai trop court entre la contamination et l'accouchement ne permet pas toujours à la réponse immunitaire du nouveau-né de faire apparaître des anticorps spécifiques dès la naissance.

Les IgM apparaissent ainsi plus facilement détectées lorsque la séroconversion a eu lieu au cours du 3^{ème} trimestre et les IgA lorsque celle-ci s'est produite au cours des 1er et 2ème trimestres. Les IgM des séroconversions précoces peuvent en effet avoir disparu à la naissance alors que les IgA produites plus tardivement sont encore présentes.

Plusieurs études rapportent en effet que 30 à 50 % des enfants ne présentent pas d'IgM et/ou d'IgA antitoxoplasmique à la naissance (Fricker-Hidalgo, Pelloux et coll. 1996; Robert-Gangneux, Gavinet et coll. 1999).

Pour la mise en évidence des **IgM** chez le nouveau-né, la sensibilité rapportée est de l'ordre de 80 % dans certaines études (Robert-Gangneux, Gavinet et coll. 1999; Morin 2002), plus faible dans d'autres : 64 % (Foudrinier, Villena et coll. 2003) ou encore autour de 44 % (Naessens, Jenum et coll. 1999).

En ce qui concerne les **IgA**, les résultats des études sont controversés : certains auteurs rapportent une meilleure sensibilité par rapport aux IgM : 65 % contre 41 % pour Naessens en 1999 (Naessens, Jenum et coll. 1999), 75 % contre 61 % pour Bessières en 1992 (Bessieres, Roques et coll. 1992). D'autres montrent une sensibilité inférieure pour la détection des IgA, dans le sang de cordon ou le sang périphérique du nouveau-né, soit entre 40 et 50 % contre 70 à 90 % pour les IgM en ISAGA, 60 à 80 % pour les IgM en ELISA. Cette même étude affirme de plus que les IgA ne sont pas détectées plus précocement que les autres classes d'anticorps et suite à ces observations souligne le manque d'intérêt des IgA dans le diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale.

Néanmoins, il est encore d'usage d'avoir recours aux IgA dans le bilan et le suivi post-natal de l'enfant, comme argument supplémentaire d'atteinte fœtale ou en cas de rebond sérologique en particulier.

Enfin, la *spécificité* de la détection des IgM et IgA est bonne et relativement comparable, aux alentours de 78 % (Robert-Gangneux, Commerce et coll. 1999).

Il est d'usage d'associer la recherche d'IgM et d'IgA chez l'enfant.

La recherche des IgE est moins documentée et n'est pas de pratique courante pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale. Néanmoins, une étude récente rapporte certes une

sensibilité inférieure à celle des IgM et A (respectivement, 59 %, 64 % et 76 %) mais un gain de sensibilité notable en combinant les 3 isotypes, sensibilité atteignant alors 81 %. Les auteurs affirment également qu'une réascension du titre des IgE au cours du traitement de l'enfant traduirait une dose inadéquate ou une mauvaise compliance au traitement (Foudrinier, Villena et coll. 2003).

❖ **Synthèse néonatale d'IgG :**

A la naissance, les IgG détectées sont les immunoglobulines transmises par la mère et/ou les immunoglobulines synthétisées par le nouveau-né. La mise en évidence de ces dernières est possible en calculant la charge immunitaire (rapport gammaglobulines spécifiques / gammaglobulines totales) et/ou en titrant les IgG. La stabilité ou l'ascension des titres d'IgG et/ou de la charge immunitaire au cours de la surveillance traduit une synthèse d'Ac par l'enfant, atteint de toxoplasmose congénitale.

❖ **Profils immunologiques comparés : le Western Blot :**

Pour améliorer la sensibilité et la spécificité des techniques sérologiques à la naissance et au vu des difficultés à différencier les Ac maternels transmis de ceux synthétisés par l'enfant, des techniques analytiques comparatives ont été développées et en particulier le Western Blot ou immunoblot.

Des bandes de nitrocellulose constituées d'un mélange d'antigènes toxoplasmiques séparés par électrophorèse sont incubées avec le sérum de la mère et du bébé. La révélation des Ac spécifiques se fait par méthode immunoenzymatique. Ainsi l'apparition de bandes décelées uniquement chez l'enfant, ou avec une intensité supérieure à celles de la mère traduit une synthèse d'anticorps (IgG ou IgM) par l'enfant.

La **spécificité** de la technique est excellente, 96 % (Tissot Dupont, Fricker-Hidalgo et coll. 2003) et jusqu'à 100 % (Robert-Gangneux, Gavinet et coll. 1999; Morin 2002).

La **sensibilité** est très bonne, voire supérieure à celle des IgM en ISAGA (83 % contre 70 %) (Tissot Dupont, Fricker-Hidalgo et coll. 2003).

➔ Ces techniques sont à utiliser conjointement à la détection des isotypes spécifiques, ce qui permet d'augmenter la sensibilité des techniques utilisées en période néonatale, à 78 % à la naissance et jusqu'à 94 % dans les 3 premiers mois de vie en combinant avec la recherche des IgG, IgM et IgA par les techniques sérologiques conventionnelles (Robert-Gangneux,

Commerce et coll. 1999; Rilling, Dietz et coll. 2003). Au cours du suivi fait pendant la première année de vie de l'enfant, en combinant toutes les méthodes précédemment citées, on arrive à une sensibilité globale de 98% pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale (Pinon, Dumon et coll. 2001).

L'application du Western-Blot dans le suivi des nouveau-nés jusqu'à l'âge de 3 mois apparaît nécessaire, en particulier dans les séroconversions des deux premiers trimestres.

Robert-Gangneux en 1999 insiste sur l'intérêt de renouveler le Western-Blot tous les mois en cas de séroconversion précoce des mères, en raison du manque de maturation du système immunitaire fœtal avant la 20^{ème} semaine, ou au contraire en cas de séroconversion très tardive, le délai n'ayant pas été suffisant entre l'infection et la naissance pour observer la synthèse d'Ac.

Cependant, le coût de la réaction constitue un handicap à l'extension de la technique en test de routine de diagnostic de la TC. Il semble bien réservé à des indications précises de diagnostic, en cas de négativité du diagnostic anténatal, de négativité des tests classiques de recherche d'IgM et d'IgA, de suivi des enfants nés de mère ayant contracté la toxoplasmose au cours du 1^{er} trimestre ou au 9^{ème} mois de grossesse (Morin 2002).

Tableau 5 : comparaison des différentes techniques de diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale (Morin 2002).

TC		Inoculation placenta	Inoculation SC	IgM	IgA	WB
TC-	Cas étudiés	13	13	13	13	13
	Cas négatifs	13	13	9	11	13
	Spécificité %	100	100	69	84	100
TC+	Cas étudiés	20	19	20	20	20
	Cas positifs	19	6	9	7	14
	Sensibilité %	95	31	45	35	70

60

Le tableau ci-dessus rapporte les résultats d'une étude récente sur 33 enfants (13 TC- et 20 TC+) en détaillant les performances de chaque technique isolement.

4. Prise en charge de la séroconversion maternelle

4.1. Prise en charge d'une séroconversion pergravidique

La figure suivante résume la conduite à tenir en fonction des résultats des bilans biologique et para clinique, et leur interprétation quant à l'atteinte ou non de l'enfant.

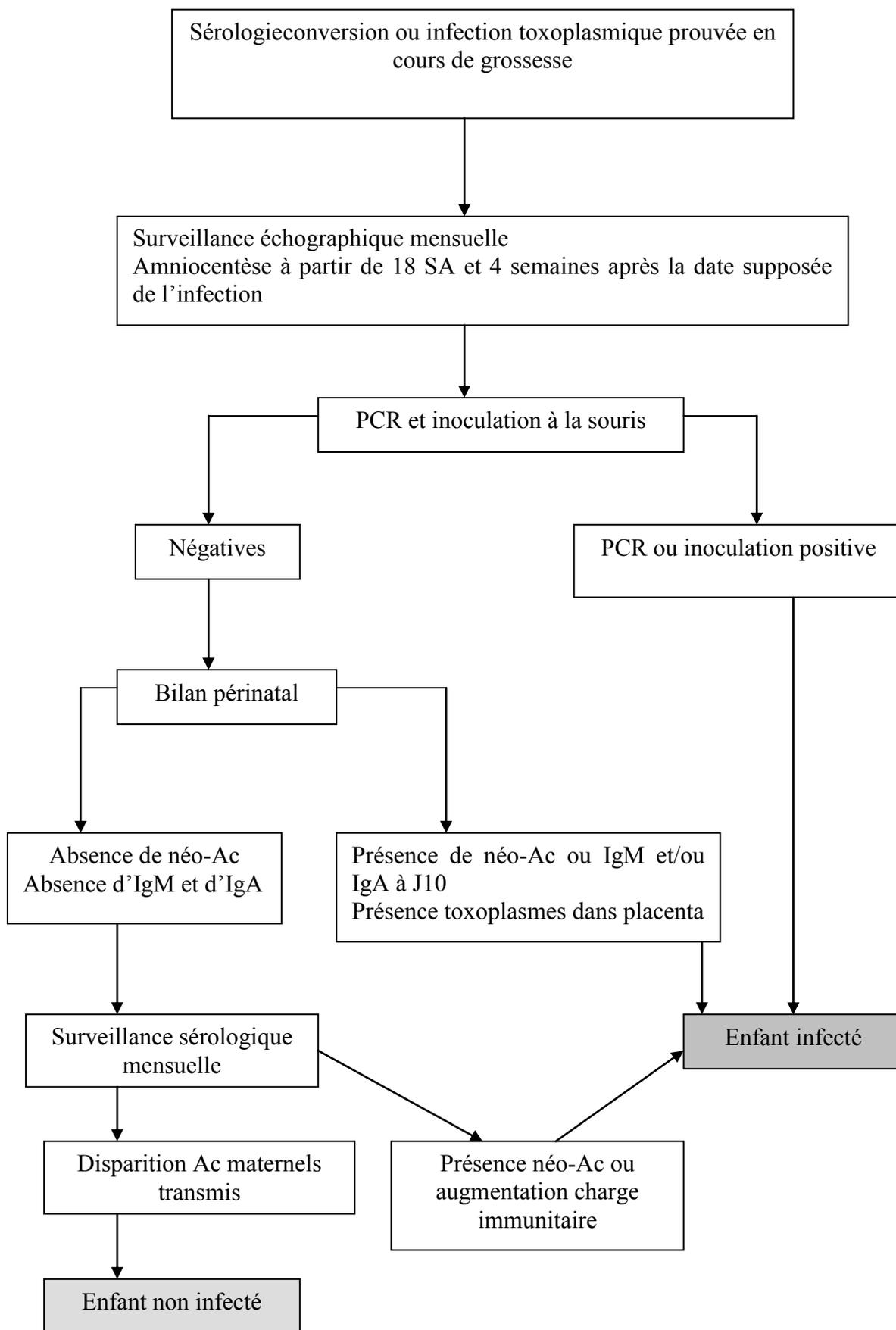


Figure 18 : Stratégie de diagnostic d'une toxoplasmose congénitale devant une séroconversion ou une infection toxoplasmique récente pendant la grossesse (d'après Bessières, 2003)

En pratique, dans les pays de la Loire, la conduite à tenir n'est pas tout à fait identique et tient compte de la date de contamination maternelle pour la prise en charge.

Le protocole développé ci-dessous est celui préconisé par le Réseau « Sécurité Naissance - Naître ensemble » des Pays de la Loire (décembre 2006). Il est adapté à la date de contamination maternelle.

❖ **Séroconversion péri-conceptionnelle :**

Elle s'étend de 1 mois avant la conception supposée jusqu'à 15 jours après.

En cas de séroconversion : ➔ Instaurer un traitement par spiramycine : 9 millions UI/j.

➔ Surveillance échographique mensuelle : *si apparition de signe d'appel échographique :*

- amniocentèse à un âge gestationnel >18 SA (PCR et inoculation à la souris).
- IRM cérébrale fœtale à 32 SA.

➔ Bilan maternel à l'accouchement.

➔ Bilan de l'enfant en période néonatale.

Allant dans le même sens que l'équipe des Pays de Loire, Wallon en 2002 étudie précisément les conséquences et la conduite à tenir en cas d'infection toxoplasmique de début de grossesse. Elle confirme que la probabilité d'infection fœtale est faible et se traduit alors souvent par une perte fœtale spontanée. Par contre, elle rapporte, que contrairement aux idées reçues, lorsque la grossesse est menée à terme sans anomalie, les séquelles chez les enfants contaminés sont minimales. Ainsi, elle recommande la même conduite qu'en cas de contamination un peu plus tardive, soit : Spiramycine, surveillance échographique mensuelle, amniocentèse à partir de 18 SA puis, si la PCR est positive, traitement par sulfamides et pyriméthamine (Wallon, Gaucherand et coll. 2002; Berrebi, Bardou et coll. 2006).

❖ **Séroconversion maternelle du 1^{er} et du 2^{ème} trimestre (➔26 SA) :**

- ➔ Un traitement initial par spiramycine 9 M UI/j est instauré.
- ➔ Surveillance échographique mensuelle.
- ➔ Amniocentèse à un *terme > 18 SA et au minimum 4 semaines après la date de la séroconversion* : ✓si PCR négative : poursuite de la surveillance échographique + spiramycine.

✓si PCR positive : traitement par pyriméthamine et sulfadiazine en cure discontinuée.

- ➔ IRM cérébrale fœtale sur signe d'appel échographique ou si PCR positive.
- ➔ Bilan maternel à l'accouchement.
- ➔ Bilan de l'enfant en période néonatale.

❖ **Séroconversion maternelle à partir de 26 SA :**

- ➔ Surveillance échographique mensuelle.
- ➔ Traitement par pyriméthamine et sulfadiazine.
- ➔ Bilan à l'accouchement.
- ➔ Bilan néonatal et suivi post-natal prolongé de l'enfant.
- ➔ IRM cérébrale fœtale sur signe d'appel échographique.

Les traitements cités ci-dessus consistent plus précisément en :

★ Spiramycine : Rovamycine[®] 3 M UI comprimé pelliculé : 3/ jour soit 9 M UI/j.

★ Pyriméthamine: Malocide[®] 50mg cp : 1/j et sulfadiazine : Adiazine[®] 500 mg cp : 6/j.

Le traitement se fera par cure discontinuée de 4 semaines en alternance avec 2 semaines de Rovamycine[®].

★ Acide folinique, soit : Lederfoline[®] solution buvable à 50 mg : 1/semaine.

ou Folinoral[®] gél 25 mg : 2/semaine.

Il est conseillé de faire une surveillance de la NFS et des plaquettes en raison du risque de pancytopenie.

Le contrôle de la NFS se fera à J0 et J15, puis une fois par mois.

En cas de neutropénie ($PN < 800/mm^3$), il convient d'arrêter le traitement anti-toxoplasmique et de poursuivre l'administration d'acide folinique. On peut reprendre le traitement lorsque les PN sont $>800/mm^3$.

La prise en charge de toute séroconversion pergravidique ou periconceptionnelle associe une surveillance échographique régulière, un traitement antiparasitaire dont les modalités dépendent de la date de la séroconversion et éventuellement une amniocentèse à la recherche de toxoplasmes. Le bilan néonatal et le suivi post-natal de l'enfant seront de rigueur dans tous les cas de figure.

4.2. Suivi des enfants

4.2.1. *Prise en charge thérapeutique des enfants*

Dès la naissance, un bilan complet est pratiqué sur le nouveau-né : clinique, para clinique et parasitologique comme vu précédemment pour poser ou non le plus vite possible le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

Celui ci est certain en cas de diagnostic prénatal positif et/ou de diagnostic néonatal positif et/ou de persistance des IgG après l'âge de 1 an.

C'est dans ce contexte que l'enfant est traité.

Pour les autres enfants, dont le diagnostic de toxoplasmose congénitale est improbable, il n'y a pas de traitement entrepris mais l'enfant est tout de même suivi pour ne pas méconnaître une toxoplasmose congénitale avec séroconversion retardée.

Le schéma suivant détaille les étapes du diagnostic positif de toxoplasmose congénitale et les cas où un traitement spécifique est débuté.

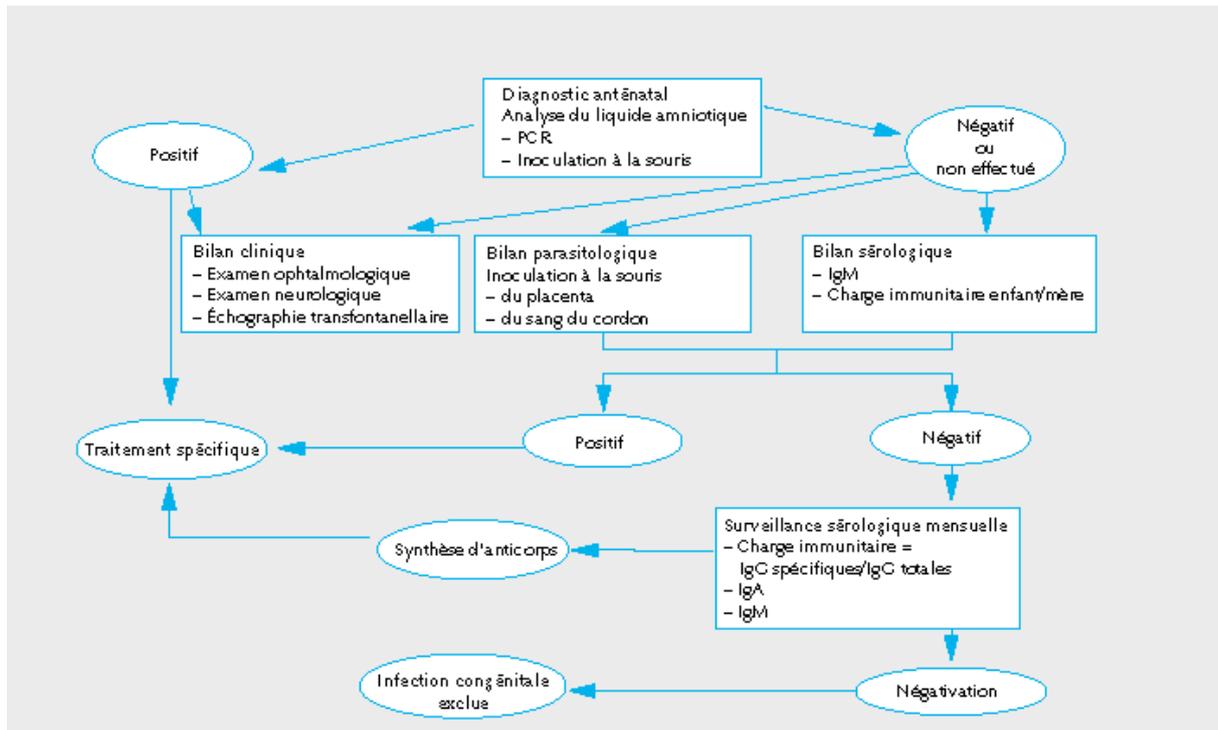


Figure 19 : Etapes du diagnostic de la toxoplasmose congénitale chez l'enfant et sa prise en charge (Romand, 1998).

L'importance de la rapidité à poser le diagnostic et donc à démarrer le traitement antiparasitaire tient au fait qu'il est rapporté dans plusieurs études que le traitement des enfants diminuerait les conséquences cliniques chez l'enfant, et que cela serait d'autant plus vrai avec une mise en route précoce après la naissance (McAuley, Boyer et coll. 1994) ; (Roizen, Swisher et coll. 1995; Wallon, Kodjikian et coll. 2004; McLeod, Boyer et coll. 2006) .

Le traitement postnatal diminue la réponse inflammatoire au niveau des organes atteints et le risque de développement de la forme sévère de l'infection.

Il améliore le pronostic neurologique avec diminution du développement de nouvelles lésions cérébrales, de la surdité et une augmentation du quotient intellectuel et des performances psychomotrices (McAuley, Boyer et coll. 1994). Le pronostic ophtalmologique semble aussi être amélioré (Yuksel, Van Acker et coll. 1999).

Ces résultats sont controversés dans d'autres études ne mettant pas en évidence de bénéfice du traitement sur le risque de lésions oculaires (Petersen 2007).

Les protocoles de traitement des enfants diffèrent selon les centres, mais la durée du traitement est généralement de 12 mois en continu.

Différents schémas sont possibles, citons ceux proposés par les équipes de Paris, Lyon et Marseille :

1.

Malocide[®]	Pyriméthamine	1 mg / kg / jour en 1 prise pendant 2 mois puis 0.5 mg/kg / jour
Adiazine[®]	Sulfadiazine	100 mg / kg / jour en 2 prises
Lederfoline 50[®]	Acide folinique	50 mg ou 2 x 25 mg tous les 7 jours

OU

2.

Fansidar[®]	Pyriméthamine	1,25 mg / kg tous les 10 jours
	Sulfadoxine	25 mg / kg tous les 10 jours
Lederfoline 50[®]	Acide folinique	50 mg ou 2 x 25 mg tous les 7 jours

OU

3.

Pour tenir compte

- 1) de la possibilité d'effets secondaires plus graves sous Fansidar[®] que sous Malocide[®] et Adiazine[®]
- 2) du fait que ces effets surviendraient préférentiellement pendant les 2 premiers mois de traitement
- 3) de la simplicité de l'administration du Fansidar[®] (tous les 10 jours) qui favorise la compliance en cas de traitement prolongé,

on peut conseiller :

Malocide[®] et Adiazine[®] pendant deux mois, pour tester la susceptibilité individuelle, puis **Fansidar[®]** pendant 10 mois.

Malocide[®], Adiazine[®], Fansidar[®] sont des gélules préparées par une pharmacie hospitalière en fonction du poids de l'enfant.

Lederfoline 50[®] est administrée en une prise per os par semaine et est remboursée si elle est prescrite par un médecin hospitalier et délivrée par une pharmacie hospitalière.

Des corticoïdes peuvent être prescrits sur avis ophtalmologique.

Il est préconisé de contrôler la **NFS à J0 et J15, puis une fois par mois** : en cas de neutropénie ($PN < 800 / \text{mm}^3$), arrêter le traitement anti-toxoplasmique et poursuivre l'administration d'acide folinique ; reprendre le traitement lorsque les PN sont $> 800 / \text{mm}^3$.

Assurer une **surveillance clinique, ophtalmologique et sérologique tous les 3 mois**.

Des négativations transitoires de la sérologie peuvent survenir sous traitement : il ne faut alors pas en tenir compte.

Après l'arrêt du traitement, il convient de poursuivre la **surveillance ophtalmologique**

- o tous les 3 mois pendant la deuxième année
- o tous les 6 mois pendant la troisième année
- o puis tous les ans, à vie.

Il est conseillé de ne reprendre le traitement qu'en cas de mise en évidence de lésions actives ou de récurrences à l'examen du fond d'œil. Dans ce cas, il est d'usage de reprendre un traitement pendant 3 mois et contrôler la cicatrisation des lésions. Notons enfin qu'un rebond sérologique sans manifestation oculaire associée ne justifie pas la reprise du traitement.

Ces recommandations sont issues du site nommé ci-dessous, faisant intervenir les centres de Paris, Lyon et Marseille.

(<http://spiral.univ-lyon1.fr/17-SWF/page.asp?id=1057&page=&sdp=1>)

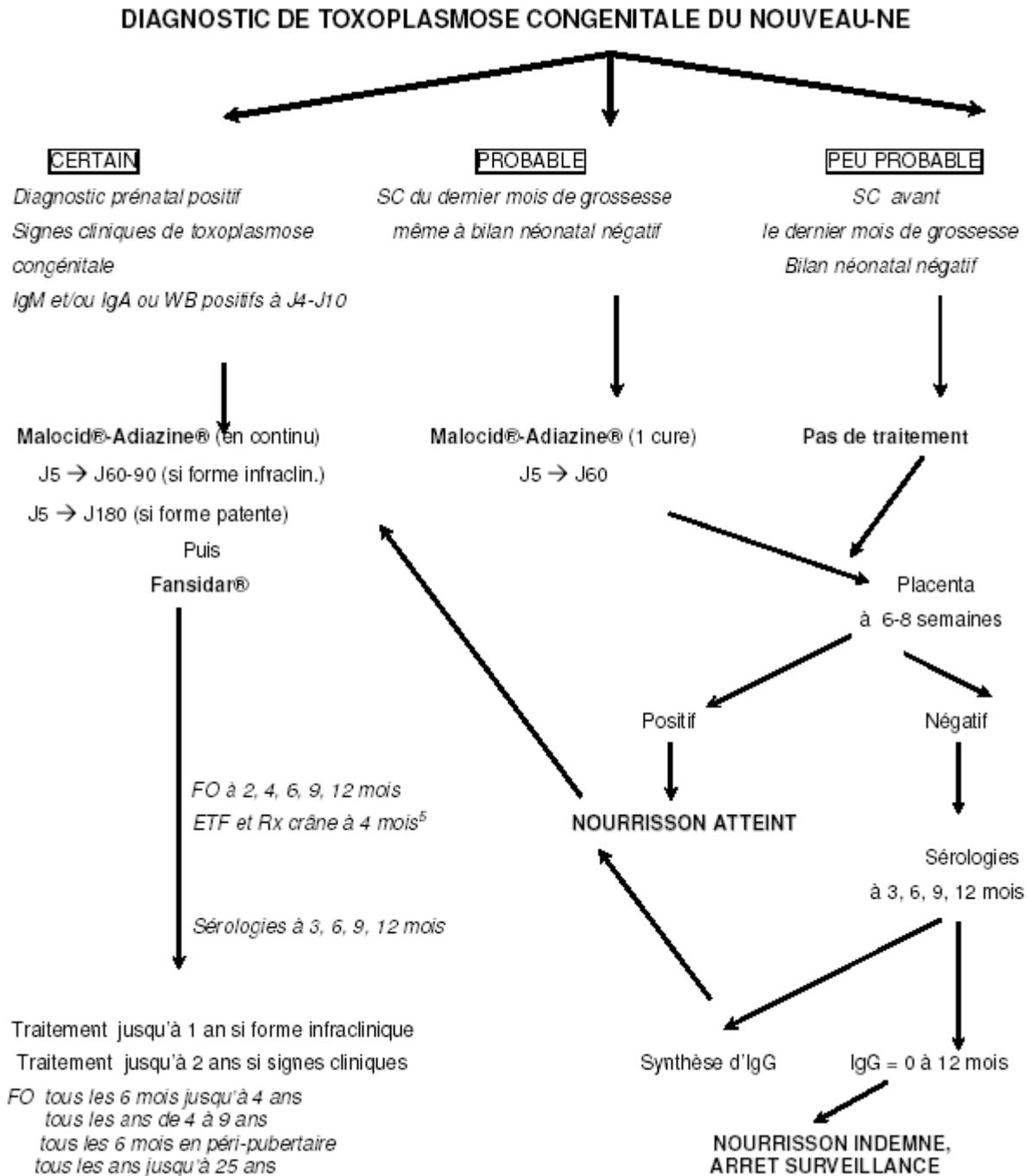


Figure 20 : Protocole de traitement des nouveaux-nés selon les situations (Réseau 2006).

Les enfants atteints de toxoplasmose congénitale sont traités pendant 1 an par l'association de pyriméthamine et d'un sulfamide (+ acide folique). En parallèle seront pratiqués un suivi de la NFS ainsi qu'une surveillance clinique, sérologique et ophtalmologique régulière. Le suivi ophtalmologique sera à poursuivre à vie. En l'absence de preuve d'atteinte, les autres enfants ne sont pas traités mais suivis leur 1^{ère} année de vie sérologiquement.

4.2.2. Surveillance clinique des enfants

Il est important pour le pédiatre d'identifier dès la naissance les enfants à risque de développer des lésions ultérieurement. Différents paramètres ont été décrits comme étant associés à un risque de rechute : infection maternelle des 2 premiers trimestres, présence de calcifications intracrâniennes, de signes neurologiques, de chorioretinite et la synthèse locale d'Ac dans le LCR à la naissance et dans la première année de vie (Couvreur 1993).

La **choriorétinite** est la manifestation retardée la plus fréquente de la toxoplasmose congénitale (jusqu'à 25 % des enfants infectés). Son délai d'apparition est variable : 11 % des lésions oculaires sont diagnostiquées avant l'âge de 1 mois, 50 % avant 1 an, 76 % avant 5 ans et 95 % avant 10 ans (Wallon, Kodjikian et coll. 2004). Les lésions ophtalmiques tardives surviennent plus souvent chez des enfants non traités.

Une surveillance ophtalmologique très régulière est donc indispensable.

Il est conseillé dans certains protocoles de faire un fond d'œil tous les 6 mois jusqu'à 4 ans (voire dans certains centres à 2, 4, 6, 9 et 12 mois la 1^{ère} année), tous les ans de 4 à 9 ans, tous les 6 mois en période péri-pubertaire (période de recrudescence des chorioretinites) et tous les ans jusqu'à 25 ans (Réseau 2006).

Les complications neurologiques, bien plus rares, se traduisent par un développement psychomoteur anormal. Elles sont précoces et surviennent essentiellement dans les cas de toxoplasmose congénitale patente.

Une surveillance neurologique et ophtalmologique au long cours est indispensable. Les principales atteintes sont oculaires, à type de chorioretinite. Elles apparaissent dans les premières années de vie de l'enfant ou au moment de la puberté. Un traitement précoce pourrait limiter leur survenue ou leur importance.

4.2.3. Surveillance sérologique

Elle est capitale et doit être faite de façon régulière : des sérologies à 3, 6, 9 et 12 mois doivent être réalisées la 1^{ère} année de vie au minimum. **La persistance d'IgG à 1 an signe de façon catégorique l'infection congénitale de l'enfant.**

Cette sérologie est indispensable pour écarter le diagnostic de toxoplasmose congénitale, mais pas toujours faite par les médecins suivant les enfants nés de mère ayant contracté la toxoplasmose durant leur grossesse, point que nous aborderons en détail dans notre étude personnelle.

Quand le diagnostic néonatal n'apporte pas de preuve d'infection congénitale, il faut donc *continuer le suivi sérologique jusqu'à négativation complète de la sérologie* (en théorie à confirmer sur deux prélèvements successifs). Elle traduit la disparition progressive des anticorps maternels transmis, catabolisés de moitié tous les mois (demi-vie de 28 jours). Le délai de négativation est fonction du taux d'anticorps maternels transmis.

En cas d'apparition de néo-anticorps, se traduisant par une augmentation du titre des IgG ou de la charge immunitaire, par la présence d'IgA ou M confirmée à 15 jours de vie, ou par des profils immunologiques comparés positifs, le diagnostic de toxoplasmose congénitale est posé.

Plusieurs évolutions sont possibles pour les sérologies :

- Diminution puis négativation des titres d'IgG → pas d'atteinte congénitale.
- Apparition de néo-anticorps, comme vu ci-dessus.

- Rebonds sérologiques sous traitement [peu fréquents mais pouvant précéder la mise en évidence de complications cliniques (Fortier, Coignard-Chatain et coll. 1997)] ou à l'arrêt du traitement, fréquents (dans 90 % des cas dans l'étude de Villena en 1998) et de signification peu claire quant au développement de complications cliniques ultérieures (Villena, Aubert et coll. 1998; Wallon, Cozon et coll. 2001; Kieffer, Thulliez et coll. 2002).

Ainsi, Wallon en 2001 affirme que des calcifications intracrâniennes à la naissance sont associées à un risque relatif augmenté de rebond sérologique, et qu'un traitement par l'association pyriméthamine - sulfadoxine entre 2 et 12 mois à un risque diminué. Par contre, elle ne démontre pas de lien entre rebond et lésions oculaires secondaires, ni de bénéfice d'une ligne de traitement additionnelle en cas de rebond sérologique à l'arrêt du traitement initial.

2ème partie : Etude personnelle :

**Bilan de 86 cas de séroconversions pergravidiques
survenues entre juillet 2004 et octobre 2005.**

**Place de la PCR effectuée sur le placenta par rapport aux
autres techniques utilisées.**

I. PATIENTS, MATERIEL ET METHODES

L'objectif de notre travail était d'évaluer la PCR sur le placenta par rapport à l'inoculation aux souris et de voir quelle place la PCR pouvait prendre dans le bilan néonatal de l'enfant par rapport aux autres techniques utilisées. Dans ce but, la centralisation de renseignements concernant la mère et l'enfant était nécessaire en vue d'avoir le diagnostic définitif retenu quant à l'atteinte ou non de l'enfant. La 1^{ère} partie de notre travail portera donc sur le recueil de ces renseignements et la 2nde partie sur l'analyse des résultats.

1. Patients

Notre étude a porté sur **86** couples mère-enfant. Ces 86 dossiers inclus correspondaient aux 86 placentas reçus entre janvier 2005 et juillet 2006, des hôpitaux du Mans, Angers, Cholet, Saint Nazaire, Lorient, Challans, Chateaubriant et Nantes, ainsi que de la Clinique Jules Verne, de la Clinique Brétéché et de la Polyclinique de l'Atlantique en région nantaise. Seulement 6 placentas sur 86 provenaient du CHU de Nantes.

Comme il est recommandé de le faire en cas de séroconversion pendant la grossesse ou en période périconceptionnelle, les placentas nous avaient été envoyés pour l'inoculation aux souris, technique non réalisée dans tous ces établissements.

Dans de rares cas, les placentas envoyés correspondaient à des séroconversions anteconceptionnelles allant de 4 mois avant la conception jusqu'à 15 jours avant, ce qui ne correspond pas aux recommandations de prise en charge actuelles.

L'analyse des placentas s'intégrait dans le cadre du bilan fait à l'accouchement qui comprend un bilan clinique, para clinique (ETF, radio du crâne, fond d'œil) et biologique (analyse du placenta et du sang de cordon, recherche d'IgG, IgA et IgM dans le sang du bébé, voire profils immunitaires comparés mère/enfant).

Les placentas étaient traités selon la procédure en vigueur au laboratoire pour l'inoculation aux souris et ce résultat était rendu aux cliniciens. La technique de PCR avait été adaptée au placenta en se basant sur la méthodologie utilisée pour le liquide amniotique, mise au point à l'occasion d'une thèse dans notre laboratoire (Priest 2003). PCR et inoculation étaient faites en parallèle de façon prospective, sans rendre les résultats de la PCR tant que la

technique n'avait pas été évaluée (sauf rares exceptions, où la PCR étant positive, nous la rendions aux cliniciens).

Deux patientes avaient été exclues d'emblée de l'étude : l'une ayant fait une séroconversion plus de 4 mois avant la conception et l'autre dont la séroconversion n'était pas prouvée, et n'ayant eu aucune surveillance échographique particulière et uniquement un bilan néo-natal, sans aucun suivi post-natal de l'enfant.

2. Analyse du placenta

➤ Inoculation aux souris :

Les placentas (200g minimum), prélevés le plus aseptiquement possible et placés dans un flacon stérile, sans conservateur, stockés à +4°C, étaient adressés au laboratoire dans les meilleurs délais (<24 h).

Deux cent grammes de placenta, prélevés dans des sites divers de l'organe, étaient lavés puis broyés et traités par la trypsine à 2,5% (digesteur de protéines) et par 100 000 UI de pénicilline et de la streptomycine pour éviter des contaminations bactériennes, pendant 2 h, à 37°C, en bain-marie agité.

Après filtration et centrifugation (3250 tours/minute pendant 20 minutes), le culot était lavé 3 fois en eau physiologique stérile réfrigérée puis centrifugé à nouveau 20 minutes. Une fois remis en suspension, on lui ajoutait à nouveau de la streptomycine. L'inoculum était alors prêt pour inoculer les souris.

Un lot de 10 souris femelles était inoculé par voie intra-péritonéale à raison de 1 à 2 mL par souris suivant les recommandations de Desmonts en 1974 (Desmonts and Couvreur 1974).

Les souris ainsi inoculées étaient prélevées au niveau de la veine caudale après 3 et 6 semaines. La recherche d'IgG spécifiques était effectuée par technique d'agglutination selon les recommandations de Desmonts en 1974 (Toxoscreen[®] BioMérieux). Les souris dont la sérologie était positive étaient sacrifiées pour la recherche de kystes de toxoplasmes dans le cerveau. Si cette recherche était négative, de nouvelles souris étaient inoculées par voie intra-péritonéale avec un broyat du cerveau des souris positives en sérologie. Cette mise en évidence de kystes de toxoplasme au microscope est indispensable au diagnostic.

➤ **PCR :**

▪ Préparation des échantillons :

Les phases initiales de préparation du placenta en vue de l'inoculation et en vue de la PCR étaient les mêmes : la prise d'essai de 200 g de placenta ponctionné en différents endroits était la même pour les deux techniques. Le placenta était ensuite lavé et broyé puis directement aliquoté, aliquot qui servait ensuite à l'étape d'extraction de l'ADN toxoplasmique.

La technique d'extraction utilisée était le High Pure PCR Template de Roche[®].

On utilisait un témoin de l'absence d'inhibiteur de PCR soit un contrôle positif (IPC), ainsi qu'un témoin négatif de réaction (eau distillée stérile) et qu'un témoin positif contenant de l'ADN toxoplasmique en quantité connue.

▪ Technique de PCR en temps réel (ameziane 2005) :

La technique utilisée a été développée dans notre laboratoire lors d'un mémoire de D.E.S, expérimentant la PCR en temps réel sur les liquides amniotiques (Priet 2003). Ce travail s'appuyait sur les données de la littérature et en particulier sur l'article de Lin en 2000 (Lin, Chen et coll. 2000).

○ **Conditions de la réaction de PCR en temps réel :**

La réaction se déroulait dans un volume de 25 µL, avec une prise d'essai de 5 µL pour l'échantillon à analyser.

❖ **Composition du *mix* de PCR utilisé au laboratoire :**

Pour 1 échantillon de placenta :

MIX DETECTION + IPC	Concentration initiale	Volume (µL)	Concentration finale
Tampon 10 X	10 X	2,5	1 X
dNTP AUCG Eurogentec	2,5 mM	2	0,2 mM
MgCl ₂	25 mM	6	6 mM
TOXO S	10 µM	0,5	0,2 µM
TOXO F	10 µM	1,25	0,5 µM
TOXO R	10 µM	1,25	0,5 µM
IPC Mix (primers et sonde)	10 X	1,25	0,5 X
IPC DNA 50 X Applied	50 X	0,25	0,5 X
Taq gold	5 U/µL	0,1	0,02 U/µL
Eau distillée		4,9	

Ce *mix* ainsi préparé pouvait être congelé et utilisé ensuite dans les 3 mois.

L'extrait à analyser était ajouté à ce *mix*, soit 5 µL d'échantillon, d'où un volume final de 25 µL.

• **Réactifs utilisés :**

1. Primers :

Les cibles choisies se situent sur le gène B1 et possèdent les séquences nucléotidiques suivantes :

Forward Primer : **TOXO F : 5'- TCC CCT CTG CTG GCG AAA AGT -3'** 21 pb

Reverse Primer : **TOXO R : 5'-AGC GTT CGT GGT CAA CTA TCG ATT -3'** 24 pb

2. Sonde Eurogentec :

La sonde Taqman est un fragment oligonucléotidique marqué par 2 groupements fluorophores en 5' et 3'. Elle possède la séquence suivante :

TOXO S : 5'- TCT GTG CAA CTT TGG TGT ATT CGC AG -3'

Elle possède à ses 2 extrémités deux marqueurs : 6 FAM (6 carboxy-fluorescéine) en 5' (rapporteur ou fluorophore donneur ou *reporter*) et TAMRA (6 carboxy-N.N.N'-tétraméthylrhodamine) en 3' (accepteur ou bloqueur ou *quencheur*). TAMRA est un dérivé de la rhodamine alors que FAM est un dérivé de la fluorescéine.

La sonde est de petite taille, permettant aux 2 groupements fluorophores d'être proches l'un de l'autre. Ainsi, le transfert d'énergie est possible et très efficace.

Le spectre d'émission de FAM ne chevauche pas le spectre d'excitation de TAMRA, qui n'émet ainsi aucune fluorescence.

A chaque brin d'ADN synthétisé, une molécule de FAM est libérée et la quantité de fluorescence émise est directement proportionnelle au nombre de copies du gène amplifié.

3. TAQ Polymerase : (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems)

Ce kit contient le MgCl₂ 25 mM, le tampon 10 X et la Taq ayant une activité polymérasique et 5' exonucléasique. Son activation nécessite une incubation à 95°C pendant 15 minutes, inhibant ainsi toute activité prématurée au cours de la préparation des *mix*.

Le MgCl₂ est essentiel à la spécificité et à l'efficacité de la réaction. C'est le cofacteur de la Taq Polymérase.

4. Contrôle positif IPC Applera France:

Pour s'affranchir de la présence d'un éventuel inhibiteur, la réaction de PCR nécessite un contrôle positif interne. Il est directement ajouté dans le même tube de réaction contenant l'échantillon à analyser. Il est amplifié en même temps que l'ADN cible au sein du mélange contenant la Taq Polymérase. La sonde utilisée pour ce contrôle positif interne est également fluorogénique, mais le reporter est différent de celui de la sonde s'hybridant au fragment cible

du gène B1. Les deux signaux de fluorescence sont donc bien distincts et on obtient deux courbes sigmoïdes d'amplification. L'une des courbes correspond à l'échantillon et l'autre au contrôle positif interne.

5. dNTP A,C,G,U. (désoxyribonucléotides triphosphates)

Le thermocycleur en temps réel utilisé est le Rotor Gene 3000 (Corbett Research).

Cette technique est une réaction d'amplification et d'hybridation.

Le programme d'amplification du Rotor Gene comporte deux étapes dont l'une est répétée 50 fois.

- 1^{er} cycle de température : l'ADN est dénaturé à 95°C pendant 900 secondes. Dans un même temps, la Taq Polymérase est activée par la chaleur.
- 2^{ème} cycle de température (répété 45 fois) :
 - dénaturation à 95°C pendant 15 secondes.
 - hybridation et élongation à une température de 63°C pendant 60 secondes.

Les courbes obtenues, représentées ci-dessous, représentent la fluorescence émise selon le nombre de cycles. Il est répondu une valeur correspondant au cycle à partir duquel la fluorescence devient significative.

Un résultat est *positif* lorsque la fluorescence émise est significativement différente de la ligne de base (bruit de fond).

Un résultat est *négatif* s'il n'y a pas de décrochement de la fluorescence par rapport à la ligne de base (Ct nul).

Un résultat est *validé* si le témoin négatif a un Ct nul, contrairement au contrôle positif interne (IPC).

La fluorescence obtenue est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée.

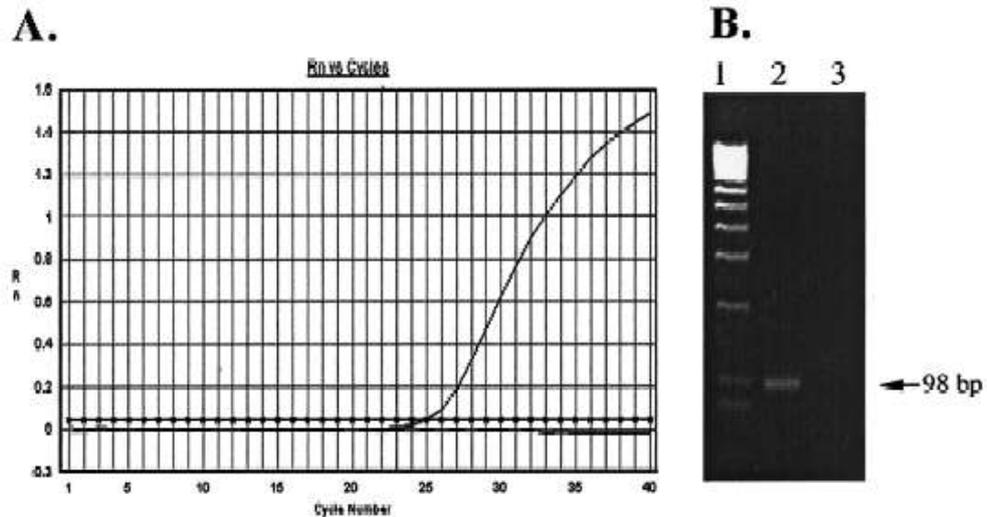


Figure 21 : PCR en temps réel pour la détection du gène B1 (Lin, Chen et coll. 2000).

Schéma A : Courbe d'amplification d'une préparation initiale d'ADN contenant 500 tachyzoïtes.

Schéma B : Le produit de PCR est visualisé sur un gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium : la 1^{ère} piste est un marqueur de poids moléculaire de DNA ; piste 2=notre échantillon de 500 tachyzoïtes (bande de 98 bp) ; piste 3 : contrôle négatif.

3. Analyse des dossiers

3.1. Liste des informations nécessaires

Afin de pouvoir conclure sur la fiabilité et l'intérêt de la technique de PCR sur le placenta dans le diagnostic de toxoplasmose congénitale, il était indispensable d'avoir le diagnostic définitif concernant l'enfant. Celui-ci était apporté au final par le résultat de la sérologie de l'enfant à l'âge de 1 an : seule une sérologie négative permet d'exclure une atteinte congénitale.

Différentes informations étaient nécessaires pour constituer des dossiers les plus complets possible :

- date de séroconversion maternelle.
- résultat parasitologique de l'amniocentèse, quand elle a été pratiquée.
- bilan néonatal de l'enfant :

- clinique, dont l'examen ophtalmologique.
- para clinique : radio du crâne, échographie transfontanellaire, scanner cérébral (si fait).
- sérologique : recherche d'IgG, IgM et IgA dans le sang de cordon puis le sang du bébé 3 à 5 jours après ; profils immunitaires comparés mère/enfant (Western Blot).
- parasitologique direct : inoculation du placenta et du sang de cordon.
- suivi post-natal de l'enfant : suivi des sérologies de l'enfant au moins la première année.

Ces informations ont été collectées de manière rétrospective.

3.2. Contacts établis

Pour récupérer les informations nécessaires citées ci-dessus, il a fallu établir de nombreux contacts :

- les maternités d'où provenaient les placentas, afin d'obtenir les coordonnées de la mère et éventuellement le nom de son médecin traitant.
- les médecins traitants, qui ont été joints par téléphone : ils nous ont renseigné quand ils se sont avérés être également les médecins traitants des enfants. Dans le cas contraire, ils nous ont parfois communiqué le nom du pédiatre suivant l'enfant ou renvoyé vers la maman pour obtenir cette information.
- les mères, contactées par courrier dans un premier temps (cf. courrier en annexe) puis par téléphone quand il n'y avait pas eu de retour à notre courrier. Elles ont toutes accepté de nous communiquer le nom de leur pédiatre.
- les pédiatres, joints par téléphone : nous leur avons demandé les informations suivantes : date de la séroconversion de la maman et résultat de l'amniocentèse (si faite), résultats du bilan à la naissance du bébé (clinique, para clinique et parasitologique), suivi clinique et sérologique de l'enfant.
- les biologistes des centres hospitaliers d'Angers et du Mans ont été directement contactés, car de nombreux placentas provenaient de ces hôpitaux. Ils ont pu fournir des renseignements sérologiques et parasitologiques directs concernant la mère et le bébé jusqu'à sa sortie de la maternité.

- Dans certains hôpitaux, les enfants concernés par une séroconversion toxoplasmique de leur mère en période pergravidique ou periconceptionnelle étaient suivis par 1 pédiatre référent, ce qui a permis un gain de temps pour certains dossiers.

3.3. Récapitulatif des informations

Les informations nécessaires ont été regroupées dans le tableau figurant en annexe 4. Elles concernent la maman, date de sa séroconversion, amniocentèse, traitement antiparasitaire pris pendant sa grossesse, et l'enfant, bilan néonatal , clinique, para clinique et parasitologique, suivi clinique (ophtalmologique) et biologique.

II. RESULTATS

1. Diagnostic final des enfants à l'âge de 1 an

Sur les **86** dossiers présents dans notre cohorte de départ :

➔ 31 dossiers ont du être exclus : - 16 l'ont été car il a été impossible de retrouver l'enfant (déménagement, mauvaise adresse...)

- 15 l'ont été car il n'a pas été possible de compléter les résultats des sérologies de l'enfant après sa naissance, soit par refus des mamans, soit par refus des médecins de prescrire la sérologie, soit par non obtention de résultats sérologiques malgré la prise de sang prescrite par le médecin mais pas faite par les patients (cas le plus fréquent).

➔ 55 dossiers ont pu être complétés : il manque dans quelques dossiers certains renseignements, tels que le résultat de l'amniocentèse de la maman, le suivi clinique et ophtalmologique régulier (donnée nous manquant le plus fréquemment) ou le résultat des dernières sérologies de l'enfant. Pour 7 dossiers, il manque la sérologie à l'âge de 1 an. Sur le dernier résultat de l'enfant connu, des traces d'IgG étaient encore présentes. Néanmoins, tout le reste des dossiers concernés allait dans le sens d'anticorps maternels transmis : bilan prénatal négatif, bilan parasitologique sur le placenta négatif, absence d'IgA et M, bilans clinique et para clinique normaux. Nous les avons donc inclus dans les dossiers d'enfants non atteints.

Sur ces 55 dossiers, 13 montrent une atteinte congénitale des enfants et 42 dossiers correspondent à des anticorps maternels transmis, soit à des enfants indemnes.

❖ **13 dossiers en faveur d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale.**

Résultats

Tableau 6 : enfants atteints de TC, soit 13 dossiers. Les dossiers en gras correspondent à ceux pour lesquels le diagnostic a pu être posé plus tôt grâce à l'analyse du placenta.

	MAMAN		DOSSIER ENFANT		PLACENTA		Sang de cordon
Numéro dossier	DATE SC	LA	Suivi clinique	suivi sérologique	PCR	Souris	souris
11	fin dernier trimestre	Pas amniocentèse	Normal	Sérologie négative à naissance ; positive dès 2 mois (IgM et IgG). Rebond à 2 ans.	pos	pos	pos
15	28SA	inconnu	Normal	Sérologie positive à naissance, IgG + à 1 an	pos	pos	/
17	dernier trimestre	Pas amniocentèse	Normal	Sérologie positive à naissance, manque sérologies après 2 mois de vie.	pos	pos	/
19	dernier trimestre	POSITIVE	Normal	G,M + à naissance; G+ à 16 mois; rebond à 2 ans	pos	pos	<u>nég</u>
23	dernier trimestre	Pas amniocentèse	Normal (à 5 mois)	Sérologie positive à naissance, rebond à 1 an.	pos	pos	<u>nég</u>
27	dernier trimestre	POSITIVE	Normal	Sérologie + dès naissance. toujours + ensuite...	pos	pos	pos
29	15-16 SA	NÉGATIVE	Choriorétinite développée à 18 mois	sérologie + à naissance, toujours + à 1 an. rebond à 18 mois.	pos	pos	/
31	??	inconnu	Normal	Sérologie + à naissance ; IgG toujours + à 1 an	pos	pos	/
43	20 SA	inconnu	Normal	Que des IgG à naissance (M,A nég) mais persistance de ces IgG à 1 an.	pos	pos	/
44	23-25 SA	inconnu	Normal	Sérologie positive à la naissance ; IgG toujours + à 1 an	pos	pos	/
58	dernier trimestre	Pas d'amniocentèse	Normal à 9 mois	Sérologie à naissance ???; G toujours +; M et A nég à 9 mois	pos	pos	/
74	32-33 SA	POSITIVE	Normal	Sérologie + à naissance (G,M et A) ; Rebond à 7 mois.	pos	pos	pos
81	36 SA	Pas d'amniocentèse	Normal à naissance	Sérologie + à naissance ; à 1 an: G toujours +; M et A négatives.	nég	pos	<u>nég</u>

Sur ces 13 cas d'atteinte congénitale de l'enfant, soit 24% de l'ensemble de nos dossiers, 9 correspondent à une *séroconversion du dernier trimestre* de la grossesse (soit 69% des cas), 3 du 2^{ème} trimestre (soit 23%) et aucun du 1^{er} trimestre. La séroconversion n'a pu être datée dans 1 cas. L'âge gestationnel moyen au moment de la séroconversion ne peut être précisément calculé car il manque des dates de séroconversion précises pour certains dossiers mais semble se situer vers la fin de grossesse dans notre étude.

➤ Diagnostic anténatal :

Nous disposons de 4 résultats d'amniocentèse : 3 positives et une négative. Cinq mamans n'ont pas eu d'amniocentèse et 4 dossiers n'ont pu être renseignés sur ce point.

➤ Bilan néonatal :

- Clinique : Aucun n'a présenté d'anomalies au bilan néonatal paraclinique ou clinique (fond d'œil, échographie transfontanellaire, radiographie du crâne).

Un seul enfant à ce jour a développé une chorioretinite, à l'âge de 18 mois.

- Biologique : pour les suivis sérologiques, 5 enfants ont fait des rebonds sérologiques : 4 après la fin du traitement (entre 18 mois et 2 ans) et 1 en cours de traitement à 7 mois (dossier n°74). La question de bonne compliance au traitement avait alors été posée.

Il est à noter qu'un dossier n'a pu être complété précisément, quant aux sérologies du bébé après la naissance. Néanmoins, le diagnostic avait pu être posé de façon certaine par d'autres examens, en l'occurrence le diagnostic néonatal (parasitologique et sérologique) positif pour ce dossier n°17 (le diagnostic anténatal n'ayant pas été fait).

Seulement 6 dossiers sur 13 ont bénéficié de l'inoculation du sang de cordon aux souris, les 7 autres cordons n'ayant pas été envoyés en vue de l'inoculation. Sur cette petite cohorte, la sensibilité de la technique est de 50%. Ce chiffre correspond aux données retrouvées dans la littérature : 16 % seulement selon Naessens en 1999 (Naessens, Jenum et coll. 1999), 43 % selon Bessièrès (Bessières, Berrebi et coll. 2001) et jusqu'à 61 % selon Morin (Morin 2002).

Ces résultats montrent que sur ces 13 dossiers, le diagnostic biologique d'atteinte congénitale de l'enfant a pu être posé avant la naissance ou dans les jours qui l'ont suivie sur les résultats de l'amniocentèse (quand elle était faite), et/ou sur les résultats du bilan néonatal pour tous les enfants, soit 100% des diagnostics de toxoplasmose congénitale. Aucun enfant n'a eu de diagnostic très tardif, avec uniquement des IgG restées positives après 1 an alors que tout le bilan néonatal restait négatif.

❖ **42 dossiers d'enfants indemnes de toxoplasmose congénitale :**

Sur ces 42 dossiers, 7 dossiers ont été inclus dans nos résultats, bien que n'étant pas tout à fait complets : il leur manque les derniers résultats des sérologies de l'enfant sa 1^{ère} année de vie, ce qui théoriquement nous empêche de conclure à sa non atteinte. Tout le reste du dossier allant dans le sens d'Ac maternels transmis, nous avons inclus ces dossiers.

Sur ces 42 séroconversions avérées :

- 6 ont eu lieu en période anticonceptionnelle ou périconceptionnelle, soit 14,3% des dossiers.
- 16 au cours du 1^{er} trimestre, soit 38% des dossiers.
- 11 au 2^{ème} trimestre, soit 26% des dossiers.
- 6 au dernier trimestre, soit 14,3% des dossiers.
- 3 n'ont pas été renseignées.

L'âge gestationnel moyen lors de la séroconversion de ces mères, non calculable dans notre étude du fait de renseignements imprécis pour certains dossiers, se situe plus tôt dans la grossesse que pour les dossiers précédents, où l'enfant est atteint.

➤ Diagnostic anténatal :

Les résultats d'amniocentèse n'ont pas toujours pu être obtenus : 11 résultats d'amniocentèse ont été renseignés : ils sont tous négatifs. Pour les autres patientes, nous ne savons pas si l'amniocentèse a été pratiquée ou non.

➤ Bilan néonatal :

- Clinique : les renseignements concernant le bilan clinique de l'enfant ont été obtenus pour 29 enfants sur 42. Aucune atteinte n'est observée.

- Biologique : toutes les sérologies de ces enfants vont bien dans le sens de la disparition des IgG maternelles présentes à la naissance. Les IgM et IgA ont toujours été négatives.

Les résultats du placenta pour 39 dossiers sur 42 sont négatifs en PCR et en inoculation aux souris.

Signalons le cas du dossier n°34 dont le diagnostic de toxoplasmose congénitale a été porté sur le résultat de l'amniocentèse, revenue positive en PCR mais négative avec l'inoculation aux souris. Le bilan néonatal, parasitologique et sérologique, est revenu négatif, ainsi que le suivi sérologique de l'enfant pendant sa première année de vie.

Les IgG présentes à la naissance se sont bien négativées la 1^{ère} année de vie de l'enfant, qui n'a de plus jamais eu d'IgM ni d'IgA dans son sérum et dont le Western-Blot était négatif également. Cet enfant a été traité pendant 1 an. Le diagnostic a donc été revu à l'âge de 1 an pour cet enfant qui est indemne de TC.

Vingt sangs de cordons ont été inoculés aux souris : 2 résultats positifs sont revenus pour des enfants indemnes, mais sans présence de kystes dans le cerveau des souris, argument indispensable pour rendre l'inoculation positive. Ces inoculations ne peuvent donc pas être considérées positives. La spécificité de cette technique est ainsi très bonne, ce qui est rapporté dans la littérature.

➔ Sur les 13 enfants atteints de toxoplasmose congénitale, les 13 placentas sont positifs en inoculation. Sur les 42 enfants non atteints, 41 placentas sont bien négatifs en inoculation et 1 est positif.

Résultats

Tableau 7 : enfants non atteints de toxoplasmose congénitale, soit 42 dossiers.

	MAMAN		ENFANT		PLACENTA		SANG DE CORDON
	date séroconversion	LA	clinique	sérologies	PCR	souris	souris
2	début 2ème trimestre	?	N	nég à 1 an	Nég	nég	Nég
3	4 mois grossesse	Négatif	N	disparition Ac à 11 mois	pos(2 dépôts/4)	Nég	Nég
4	dernier mois G	?	N	sérologie négative à 1 an	pos/nég	Nég	/
5 ???	2 mois G	Nég	N	en faveur Ac transmis: M nég, IgG négativés à 1 an.	pos(1/4)	Pos (1/10)	/
9	début G	?	N	sérologie négative mai 2007(2 ans)	Nég	nég	Nég
12	1er trimestre	Nég	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Pos (pas kystes)
13	periconceptionnelle	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
16	SC fin 1er trimestre	?	?	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/
18	pergravidique...	?	?	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/
20	1er trimestre	?	?	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
21	1er trimestre(8SA)	Nég	N	sérologie négative à 4 mois	Nég	nég	/
22	dernier trimestre	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
25	SC 20 SA	Nég	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
26	début grossesse	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
28	dernier trimestre	Nég	N	sérologie négative à 2 ans	Nég	nég	/
30	2ème trimestre	Nég	?	sérologie négativée la 1 ^{ère} année	Nég	nég	Nég
32	début 2ème trimestre	?	?	manque dernière sérologie des 1 an; dim IgG.	Nég	nég	Nég
33	35 SA	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
34	Fin 2 ^{ème} trimestre	PCR +/souris -	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
35	SCdébut G(non démontrée)	?	N	sérologie nég à 2 ans.(pas CT avant)	nég	nég	/
36	FIN 1ER TRIMESTRE	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/
39	12-14 SA	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/
42	5-10 SA	?	?	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/
46	periconceptionnelle	Nég	??	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
48	5ème mois	?	N	sérologie nég très vite (pas + de précisions)	Nég	nég	/
49	17-20 SA	?	?	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/

Résultats

50	9ème SPC	?	N	manque après 8 mois où traces d'IgG	Nég	nég	Pos(pas kyste)
52	4ème SPC	Nég	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
53	9-13 SA	Nég	N	sérologie nég à 9 mois	Nég	nég	Nég
54	17-18 SA	nég	N	manque après 3 mois; traces d'IgG encore.	Nég	nég	/
55	fin grossesse	?	N	disparition IgG à 6 mois	Nég	nég	/
57	periconceptionnelle	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
61	anteconceptionnelle	?	N	pas suivi régulier; CT à 17 mois: négatif	Nég	nég	/
64	?	?	?	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/
69	anteconceptionnelle	?	N	manque après 3 mois; traces d'IgG encore.	Nég	nég	/
70	pergestationnelle	?	N	à jour : nég à 10 mois	Nég	nég	/
71	14ème SPC	?	N	rien après 6 mois(diminution IgG)	Nég	nég	/
79	fin grossesse	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	Nég
80	4mois1/2	?	N	sérologie négative à 1 an	Nég	nég	/
83	2ème SPC	?	N	disparition°Ac maternels à 9 mois	Nég	nég	/
86	periconceptionnelle	?	N	traces d'IgG à 9 mois, M et A nég.	Nég	nég	Nég

Les dossiers en gras correspondent à nos 6 dossiers incomplets que nous avons inclus dans l'étude, car le reste des données allaient dans le sens d'anticorps maternels transmis.

2. Place de la PCR effectuée sur le placenta par rapport à l'inoculation aux souris

❖ Comparaison des 2 techniques effectuées sur le placenta : PCR et inoculation aux souris :

➤ Résultats de l'analyse du placenta chez les 13 enfants TC+ :

L'analyse du placenta a donné des résultats concordants en PCR et en inoculation aux souris pour 12 dossiers d'atteinte congénitale des enfants. Chez 1 patient, la PCR est négative alors que l'inoculation est revenue positive à 3 semaines.

Tableau 8 : résultats de l'analyse du placenta par PCR et inoculation aux souris chez les enfants TC+.

	PCR +	PCR -
Souris +	12	1
Souris -	0	0

Notons 3 dossiers discordants : 2 dossiers négatifs en inoculation et positifs en PCR et 1 dossier positif par les 2 techniques. Pour cet enfant (n°5), le diagnostic de non atteinte a été posé au vu de l'amniocentèse négative, du suivi échographique normal et des sérologies allant dans le sens d'anticorps transmis.

Tableau 9 : résultats de l'analyse du placenta par PCR et inoculation aux souris chez les enfants TC-.

	PCR +	PCR -
Souris +	<u>1</u>	0
Souris -	2	39

Nous avons reporté dans les tableaux suivants les performances des 2 techniques comparées, par rapport au diagnostic final retenu pour les enfants à 1 an de vie : l'atteinte par la toxoplasmose congénitale (TC+) ou la non atteinte (TC-).

Tableau 10 : résultats obtenus avec la PCR en temps réel sur le placenta, chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale (TC+) ou non (TC-).

	TC+	TC-
PCR placenta +	12	3
PCR placenta -	1	39
	13	42

L'inoculation aux souris est notée positive (souris +) quand, suite à leur sérologie positive à 3 ou 6 semaines [recherche d'IgG spécifiques par agglutination HS (Toxoscreen® BioMérieux)], elles ont été sacrifiées et que des kystes ont alors été mis en évidence dans leur cerveau. La mise en évidence de kystes dans le cerveau au microscope est indispensable au diagnostic. Dans le cas contraire, il est noté « souris - ».

Tableau 11 : résultats obtenus avec l'inoculation aux souris du placenta, chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale (TC+) ou non (TC-).

	TC+	TC-
Souris +	13	1
Souris -	0	41
	13	42

Le tableau ci-dessous reprend les 2 précédents pour le calcul de données statistiques importantes : sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP), valeur prédictive négative (VPN).

La VPP correspond à la probabilité d'avoir des patients « malades » avec un test positif.

La VPN correspond à la probabilité d'avoir des patients indemnes avec un test négatif.

La sensibilité des 2 techniques est de 92,3% pour la PCR et de 100% pour l'inoculation.

La spécificité des techniques est de 97,6% pour l'inoculation *versus* 92,9% pour la PCR.

La valeur prédictive positive (VPP) est de 80% en PCR et 92,9% en inoculation.

La valeur prédictive négative (VPN) est de 97,5% en PCR et de 100% en inoculation.

Le taux de faux-positifs est plus élevé en PCR (18,8 contre 7,10%).

Il n'y a pas de faux-négatifs avec l'inoculation, 1 cas sur 13 avec la PCR, soit 7,7%.

Tableau 12 : comparaison des performances de nos 2 techniques, PCR et inoculation

	PCR	Souris
Sensibilité	92,3%	100%
Spécificité	92,9%	97,6%
VPP	80%	92,9%
VPN	97,5%	100%
Faux +	18,80%	7,10%
Faux -	7,7%	0%

➤ Dans les 13 cas de toxoplasmose congénitale retenus dans notre étude, l'analyse du placenta a permis de poser le diagnostic plus rapidement dans 2 cas où le reste du bilan néonatal était négatif (sérologies de l'enfant : IgG, IgA et IgM négatives ; Western-blot négatif dans l'un des dossiers, apparemment non fait pour le deuxième) et où le bilan anténatal était négatif pour l'un et non fait pour l'autre. L'inoculation est bien revenue positive à 3 semaines.

Les sérologies de ces enfants étaient négatives à la naissance et faisaient plus pencher vers des anticorps maternels transmis. La sérologie s'est positivée à 2 mois pour le dossier n°11 avec apparition d'IgM et ascension du titre des IgG, tandis que pour le dossier n°43, il n'y a jamais eu apparition d'IgM ou A (sous traitement) mais la sérologie est restée positive à l'âge de 1 an chez l'enfant. Dans ces 2 cas de figure, l'analyse du placenta a permis un diagnostic plus rapide. Les enfants ont pu bénéficier d'un traitement plus précoce ainsi.

Pour ces 2 cas, les résultats en PCR et en inoculation étaient cohérents et positifs.

➤ Pour les enfants indemnes de toxoplasmose congénitale, 3 discordances ont été obtenues avec la PCR, dont 1 cas correspondant à un placenta également positif en inoculation pour un enfant non atteint au vu de des résultats sérologiques. Il semblerait que ce dossier n°5 corresponde à une vraie colonisation placentaire mais sans atteinte de l'enfant, ce qui est rare mais possible. Dans ce cas, il serait donc nécessaire de reconsidérer les résultats de la PCR et de l'inoculation qui ne seraient donc pas des faux-positifs...

Les autres dossiers d'enfants non atteints ont tous des résultats négatifs en PCR et en inoculation du placenta : la valeur prédictive négative de ces techniques est très bonne en effet : 100% pour l'inoculation et 97,5% pour la PCR.

III. DISCUSSION

1.Reconstitution des dossiers de nos patients en vue d'obtenir le diagnostic définitif de l'enfant

La synthèse d'anticorps par le nouveau-né au cours de la période post-natale constitue le critère de base pour confirmer une toxoplasmose congénitale. Cela nécessite une surveillance sur une période de 12 mois, les IgG transmises passivement disparaissant dans un délai de 7 à 9 mois en général. Une sérologie négative à 1 an prouve l'absence d'infection.

Il existe néanmoins un intérêt à porter le diagnostic précocement afin de pouvoir débiter le traitement le plus tôt possible, dans le but de limiter les atteintes éventuelles de l'enfant, en particulier oculaires (McAuley, Boyer et coll. 1994; Roizen, Swisher et coll. 1995; Patel, Holfels et coll. 1996; Wallon, Kodjikian et coll. 2004; McLeod, Boyer et coll. 2006).

Ceci souligne l'importance du diagnostic néonatal combinant la recherche du parasite dans le placenta et/ou le sang de cordon, et les techniques de mise en évidence d'IgG, M ou A par des techniques performantes à la recherche de la meilleure sensibilité possible.

L'objectif de notre travail était d'évaluer la technique de PCR sur le placenta par rapport à l'inoculation aux souris et de voir quelle place la PCR pouvait prendre dans le bilan néonatal de l'enfant par rapport aux autres techniques utilisées. Dans ce but, la centralisation de renseignements concernant la mère et l'enfant était nécessaire en vue d'obtenir le diagnostic définitif retenu quant à l'atteinte ou non de l'enfant.

La PCR, mise en place depuis plus de 2 ans et adaptée de la méthodologie utilisée pour l'analyse du liquide amniotique, n'avait jamais été évaluée depuis qu'elle était réalisée. Ses résultats n'étaient donc pas rendus aux cliniciens, qui ne recevaient que le résultat de l'inoculation aux souris au bout de 3 semaines en cas de positivité, ou 6 semaines dans le cas contraire, alors que les résultats de la PCR placenta étaient obtenus en quelques jours au maximum. Signalons ici qu'en pratique le laboratoire prévenait les cliniciens en cas de PCR sur le placenta positive en leur précisant bien que le résultat définitif serait donné par l'inoculation aux souris. En effet, il nous semblait difficile d'un point de vue éthique de ne pas communiquer un tel résultat. Cela s'est produit 2 fois.

Nous avons donc repris les 86 dossiers pour lesquels un placenta avait été envoyé à Nantes et tenté de les compléter afin de porter un diagnostic définitif pour chaque enfant, nécessaire pour statuer sur la fiabilité et l'intérêt de la PCR.

❖ Pour les cas de **toxoplasmose congénitale avérée** (13 en tout), les enfants ont en général été dépistés tôt et leur suivi a été fait de façon rigoureuse, donc les dossiers ont été assez facilement reconstituables, une fois le pédiatre retrouvé et contacté. Le fait que des hôpitaux comme Nantes, Angers ou Le Mans fassent suivre les enfants atteints par le même pédiatre, dans la mesure du possible, a facilité nos recherches pour ces enfants-là. Mais notre travail a aussi permis de constater que ce n'était pas toujours le cas, les pédiatres en étant les premiers surpris, ce qui a permis de renforcer leur vigilance sur ce fait.

❖ **Pour les autres cas, où l'atteinte semblait improbable** au vu des premiers éléments du dossier [diagnostic prénatal (si fait), bilan à la naissance, parasitologique et/ou sérologique], les dossiers ont été beaucoup plus difficiles à récupérer.

➤ En effet, la première étape a été de contacter les hôpitaux où les enfants étaient nés et d'obtenir le nom du médecin traitant ou du pédiatre de l'enfant. Quand cela était inconnu, ce qui s'est révélé assez fréquent, il nous a fallu contacter directement les mamans par courrier (lettre en annexe) afin d'obtenir les coordonnées du médecin suivant leur enfant en leur expliquant dans quel but, et sans les inquiéter outre mesure.

Les réponses ont été assez faibles, nous les avons donc relancées par téléphone. Cette démarche nous a permis de renseigner quelques dossiers de plus. Malheureusement, dès ce stade, certaines patientes n'ont jamais été retrouvées (coordonnées inexactes, déménagement ?) et 16 dossiers ont été perdus de vue faute de pouvoir retrouver les familles.

➤ La deuxième étape a été de prendre contact avec les pédiatres ou les généralistes suivant les enfants. Certains d'entre eux n'avaient pas notion de séroconversion toxoplasmique de la maman durant sa grossesse, donc n'avaient évidemment pas fait de suivi particulier du bébé. Certains, ayant cette information en main, ont prescrit un contrôle sérologique pour l'enfant, d'autres ne voyaient pas l'intérêt de ce contrôle sérologique tardif et ont préféré en rester là et ne pas inquiéter outre mesure les mères.

Quelques résultats ont été récupérés en relançant ainsi les médecins, ce qui nous a permis d'affirmer que l'enfant n'avait pas été contaminé, au vu de sa sérologie négative.

Malheureusement, la plupart des bilans n'ont pas été faits, les mamans n'en voyant pas l'intérêt après n'avoir été en aucun cas sensibilisées sur ce sujet depuis la naissance de leur bébé.

Dans d'autres cas, les médecins contactés ne se sont pas montrés désireux de contrôler la sérologie de l'enfant, déjà âgé de 1 à 2 ans. Il s'est avéré que cela correspondait à une séroconversion de la mère en période periconceptionnelle, et qu'il n'y avait pour les médecins en question pas de risque de transmission au fœtus, ou dans le cas contraire que cela se serait traduit par un avortement spontané ou des conséquences cliniques importantes et visibles pour l'enfant. Or les enfants qu'ils suivaient étaient tous en bonne santé générale et avaient eu un bilan clinique à la naissance tout à fait normal.

A l'issue de cette étape, longue et fastidieuse, 15 dossiers n'avaient toujours pas pu être complétés.

Cette démarche nous a permis de prendre conscience de la difficulté à centraliser les informations concernant le couple mère-enfant. Cela nous a incité à une réflexion sur ce qui pourrait être mis en place pour améliorer la situation.

En effet, dans ce contexte de toxoplasmose congénitale, diverses spécialités interviennent, gynécologues-obstétriciens, pédiatres, généralistes, mais aussi ophtalmologistes, radiologues, neurologues et biologistes.

Pour compléter le dossier, des contacts avec toutes ces disciplines sont indispensables.

Dans notre cas, les dossiers provenaient de tout l'Ouest (Bretagne et Pays de la Loire), ce qui a compliqué les choses.

➤ Une autre difficulté majeure a été de retrouver les résultats des sérologies maternelles durant la grossesse, ou au moins d'avoir la datation de la séroconversion. Nous avons alors constaté que les sérologies n'étaient pas toujours faites dans le même laboratoire ce qui rendait leur suivi et leur interprétation difficile, en raison de la variété des techniques utilisées dans le diagnostic de la séroconversion toxoplasmique.

De plus, dans notre démarche de recherche d'informations, nous avons contacté les pédiatres ou médecins généralistes des enfants, mais pas les gynécologues ayant suivi la grossesse de la mère, car nous n'avions pas demandé de précisions quant à leur identité. Cela aurait multiplié

par deux le travail en terme de contacts écrits ou téléphoniques, ce qui nous a semblé infaisable au vu des difficultés que nous avons eu à retrouver et relancer la cinquantaine de pédiatres intervenant dans l'étude. C'est certainement un point faible de notre travail car nous n'avons en effet récupéré le résultat de l'amniocentèse que pour 21 dossiers sur 55.

En ce qui concerne les mères, nous n'avons pas pu obtenir tous les renseignements quant à leur traitement antiparasitaire pendant leur grossesse (pyriméthamine+sulfadiazine, spiramycine ou aucun traitement). Ce renseignement a une grande importance car il semble que le traitement reçu par la maman pendant sa grossesse influe beaucoup sur les résultats de l'analyse du placenta en biologie moléculaire. Ainsi, Fricker-Hidalgo, dans son étude de 2007 portant sur l'analyse de 133 placentas par les 2 techniques, montre que *T.gondii* est moins souvent isolé des placentas issus de femmes traitées par pyriméthamine-sulfadoxine que dans les placentas de celles traitées par la spiramycine ou pas traitées du tout (Fricker-Hidalgo, Brenier-Pinchart et coll. 2007). Nous ne pouvons malheureusement pas étudier ce paramètre sur notre cohorte car nous ne disposons pas de tous les renseignements requis.

Signalons aussi que tous nos contacts avec les médecins suivant les enfants ont été téléphoniques. Certains nous ont adressé des copies du dossier de l'enfant, mais la plupart nous ont communiqué oralement les résultats du suivi sérologique et clinique.

Dans l'absolu, nous aurions désiré les copies papier des dossiers, mais il s'est avéré que cela était souvent délicat, les médecins nous renseignant déjà avec la meilleure des volontés par téléphone.

Comme nous l'avons développé dans le paragraphe ci-dessus, nous avons parfois été obligés de contacter directement les mamans pour obtenir des informations sur le suivi de leur enfant, et notamment le nom du médecin le suivant. Cela correspondait à 41 dossiers qui nécessitaient de passer directement par les mamans. Sur ces 41 courriers, 8 courriers nous sont revenus, les patients n'habitant plus à l'adresse communiquée par l'hôpital qui nous avait adressé le placenta. Ces dossiers ont donc été perdus dès ce stade.

Sept réponses nous sont revenues rapidement, par e-mail en général, voire par téléphone quand les mamans exprimaient le désir d'avoir d'autres précisions.

Les 26 dossiers restant étaient en suspens : nous avons donc relancé les patientes par téléphone, quand nous disposions de leurs coordonnées téléphoniques. Environ la moitié des patientes ont pu être jointes et nous ont communiqué les renseignements demandés.

En aucun cas nous n'avons cherché à obtenir des renseignements cliniques ou biologiques directement des mamans, les seuls renseignements demandés étant les coordonnées du pédiatre ou médecin généraliste de leur bébé. Dès ce stade, malheureusement, 20 dossiers (sur nos 41) ont été perdus, ce qui a restreint notre cohorte à 66 couples mère-enfant.

✦ Pour les placentas que nous avons reçus d'Angers, nous avons pris contact avec le biologiste responsable de la toxoplasmose au sein du laboratoire et avec le pédiatre assurant le suivi des enfants nés de mère ayant fait une séroconversion toxoplasmique durant leur grossesse sur Angers.

Malheureusement, quelques enfants n'ont pas été suivis par ce médecin et n'ont pu être retrouvés.

✦ Nous avons également contacté la biologiste et le pédiatre du centre hospitalier du Mans par téléphone, car 8 dossiers nous en parvenaient.

Les enfants avaient été suivis par deux pédiatres distincts de l'hôpital, celui ayant habituellement en charge ces enfants partant à la retraite prochainement, il avait confié cette tâche à un confrère pour la suite.

Sept dossiers ont pu être complétés, 1 n'a pas pu l'être, par refus de la maman de poursuivre une surveillance au-delà de l'âge de 1 mois pour son enfant, dans le contexte d'une séroconversion antéconceptionnelle.

➔ Nous avons finalement exclu les dossiers pour lesquels nous n'avions aucun suivi sérologique des enfants, soit **31** sur nos 86 placentas de départ (soit **36 % de dossiers perdus**).

Nous avons conservé 6dossiers pour lesquels les toutes dernières sérologies manquaient, mais où tout le reste du dossier allaient dans le sens d'anticorps maternels transmis à l'enfant.

Les autres dossiers inclus correspondent à des dossiers où le suivi de l'enfant jusqu'à disparition des anticorps maternels a pu être récupéré.

➔ Toutes ces observations nous ont permis de mettre en lumière le fait que la surveillance des enfants dont la mère a fait une séroconversion pergestationnelle posait plusieurs problèmes.

Il a d'abord été constaté que la centralisation de toutes les informations concernant l'enfant et sa maman était très difficile à faire, surtout en rétrospectif, et qu'il manque un lien entre toutes les spécialités médicales intervenant.

De plus, les pédiatres contactés nous ont souvent fait la remarque qu'ils manquaient d'informations sur la conduite à tenir pour la surveillance de ces enfants. Des recommandations (harmonisées au moins sur la région) leur semblaient devoir être envoyées aux médecins prenant en charge ces enfants, par le pédiatre hospitalier ayant commencé à suivre le bébé par exemple. Nous leur avons indiqué, suite à ces remarques, l'existence du Réseau Sécurité Naissance des Pays de la Loire, qui, précisément, indique la conduite à tenir pour le suivi de ces enfants. Ces informations sont de plus facilement accessibles sur Internet à l'adresse suivante :

http://www.reseau-naissance.com/medias/proto_toxo_decembre_2006.pdf

La surveillance des enfants dont le diagnostic biologique néonatal est négatif s'est révélée des plus aléatoires dans notre cohorte de 42 enfants indemnes de toxoplasmose congénitale. Il était rare que la surveillance des sérologies de l'enfant perdure jusqu'à l'âge de 1 an ou jusqu'à la disparition totale des anticorps maternels. Nous avons très souvent eu besoin de faire prescrire un contrôle sérologique tardif pour compléter nos dossiers et conclure sur l'atteinte ou non de l'enfant.

Ce travail, dont l'objectif principal était d'évaluer notre technique de PCR sur le placenta, a permis de mettre en évidence les difficultés existant pour la prise en charge des bébés nés de mères ayant fait une séroconversion toxoplasmique pendant leur grossesse. Des problèmes de transmission d'informations entre les diverses spécialités médicales intervenant existent. A Nantes, des dossiers sont constitués pour chaque maman dont nous avons diagnostiqué la séroconversion pendant sa grossesse, comportant la date précise de sa séroconversion, le résultat de son diagnostic anténatal et son traitement. L'autre partie de ce document est réservée au bébé : nous y indiquons les résultats du diagnostic biologique néonatal, du bilan clinique et paraclinique ainsi que le traitement suivi par le bébé (*cf* annexe 6).

Le biologiste, impliqué tout au long de la démarche diagnostique, est à même d'assurer ce recueil de données cliniques, radiologiques et biologiques. Une réflexion est en cours dans les principaux centres des Pays de la Loire (Angers, Le Mans, Nantes) sur la mise en place d'un dossier identique pour tous les centres. Chaque centre se chargerait du recueil des données de ses patients, permettant de constituer ultérieurement une cohorte plus importante. Des études épidémiologiques pourraient alors être entreprises au niveau régional.

2. Evaluation de la PCR du placenta

Nous avons obtenu 13 dossiers positifs et 39 dossiers négatifs, concordants par les 2 techniques de PCR et d'inoculation.

Des discordances ont été notées : - 1 dossier est positif en inoculation seulement et non en PCR chez un enfant atteint de toxoplasmose congénitale.

- 2 dossiers sont positifs en PCR seulement et non en inoculation, chez des enfants indemnes de TC.

Tableau 13 : récapitulatif des résultats de la PCR et de l'inoculation pour nos 55 patients.

	PCR +	PCR -
Souris +	13	1
Souris -	2	39

❖ Avantages de la PCR :

La sensibilité de la PCR, bien que moins bonne dans notre étude que celle de l'inoculation, est tout de même bonne, à 92,3%. De nombreuses études montrent l'intérêt de **combinaison** les deux techniques pour augmenter la sensibilité globale de l'analyse du placenta (Fricker-Hidalgo, Pelloux et coll. 1998; Bastien 2002; Fricker-Hidalgo, Brenier-Pinchart et coll. 2007).

En outre, cette technique de PCR offre l'avantage de donner un **résultat rapide** en 24 à 48 heures, ce qui permet l'instauration du traitement antiparasitaire plus vite, point capital de l'efficacité du traitement sur la survenue ultérieure de lésions oculaires en particulier. Il est à noter que la technique en elle-même ne nécessite que 4 à 5 heures pour l'obtention d'un résultat. Mais du fait de contraintes techniques et de disponibilité de l'automate de PCR, l'analyse des placentas ne peut être réalisée en urgence « au coup par coup ». Il est nécessaire dans un souci d'économie de réactifs également de réaliser cette technique sur plusieurs placentas à la fois, ce qui peut entraîner un petit délai dans le rendu de résultats.

Deux dossiers sur les 13 dossiers d'atteinte congénitale de notre étude ont bénéficié d'un diagnostic posé précocement à la naissance par l'analyse du placenta. Ces deux dossiers avaient soit une amniocentèse non réalisée (séroconversion de toute fin de grossesse), soit non renseignée dans le dossier reconstitué. Ce point est important car il apparaît que la technique de PCR sur le placenta pourrait s'avérer très utile dans les cas d'amniocentèse négative ou non réalisée. C'est la position des auteurs de l'étude de Fricker-Hidalgo parue récemment et

pourrait devenir le critère de réalisation ou non de la PCR au laboratoire du CHU de Nantes (Fricker-Hidalgo, Brenier-Pinchart et coll. 2007).

❖ Inconvénients de la PCR :

Notre travail a montré une sensibilité inférieure à celle de l'inoculation aux souris (92,3% contre 100%), une spécificité plus faible (92,9% contre 97,6%).

La PCR est à l'origine de plusieurs **faux-positifs** (18,8% des résultats positifs contre 7,1% pour l'inoculation). Ce chiffre est important en particulier du fait d'une petite cohorte de patients, de seulement 13 dossiers de toxoplasmose congénitale et 42 d'enfants indemnes. Parmi ces enfants, 3 PCR se sont révélées positives. Ces cas de faux positifs en PCR sur le placenta ont bien été rapportés dans les publications en proportion non négligeable comme nous l'avons développé au paragraphe III.3.3.1 de notre première partie (taux de faux-positifs allant de 6 à 8.2 % dans les deux études de Fricker-Hidalgo) (Fricker-Hidalgo, Pelloux et coll. 1998; Fricker-Hidalgo 2005).

L'un de ces « faux-positifs » de la PCR est le dossier n°5 qui a également un résultat positif en inoculation. Nous penchons donc ici vers une vraie colonisation placentaire mais sans atteinte de l'enfant, ce qui est rare mais possible.

Les 2 autres cas de faux-positifs en PCR correspondent à des placentas techniqués en même temps que celui mentionné ci-dessus. Des contaminations entre échantillon sont possibles, de plus en plus rares heureusement grâce à l'utilisation systématique d'un contrôle interne négatif, qui n'était pas toujours utilisé au moment où ces placentas ont été techniqués au laboratoire. Il est probable que ce soit l'explication de ces 2 résultats positifs pour des enfants indemnes au vu de leur sérologie à l'âge de 1 an.

Un cas de faux-négatif de la PCR est rapporté dans notre travail ; l'inoculation, elle, est revenue positive à 3 semaines. Il correspond à une séroconversion du dernier mois de grossesse, où la maman avait été traitée par l'association pyriméthamine-sulfadiazine, traitement qui diminue la sensibilité de la PCR, comme cela est rapporté dans l'étude de Fricker-Hidalgo (Fricker-Hidalgo, Brenier-Pinchart et coll. 2007).

Il est à souligner le fait que nos données statistiques sont établies sur de petites cohortes (13 patients TC+, 42 patients TC-) et doivent impérativement être reprises dans de plus vastes cohortes .

❖ Un autre point soulevé dans l'étude de Fricker-Hidalgo est la question de la mise en place du traitement chez les bébés n'ayant comme seule preuve d'atteinte congénitale que l'analyse du placenta. Faut-il traiter de manière systématique ces enfants au vu de la toxicité du traitement anti-parasitaire ou attendre une autre preuve de l'infection ? L'auteur est nuancée et conseillera de prescrire le traitement chez ces enfants uniquement en cas de séroconversion de fin de grossesse, au moment où le risque de transmission est maximal.

Les recommandations du Réseau Sécurité Naissance des Pays de la Loire diffèrent légèrement car il est conseillé de traiter les bébés sans attendre, suite à une séroconversion du dernier mois de grossesse, malgré un bilan néonatal *négatif*, ce qui est considérée comme une atteinte **probable** de l'enfant dans ce document (pyriméthamine+sulfadiazine en 1 cure de J5 à J60). Le traitement est poursuivi ou arrêté en fonction des résultats de l'analyse du placenta à 6-8 semaines. Notons que la possibilité d'un résultat plus précoce du placenta par l'utilisation de la PCR n'est pas pris en compte ici car la technique n'est pas encore proposée aux cliniciens à l'origine de la rédaction du document (Réseau 2006).

Notre étude a démontré une bonne VPN de la PCR (97,5%) ce qui peut être d'une grande utilité pour ces séroconversions du dernier mois de grossesse. En effet, il est envisageable de proposer aux cliniciens cette technique de PCR dès la naissance et d'attendre son résultat pour décider de la mise sous traitement du bébé. Un résultat négatif par cette technique éviterait ainsi bon nombre de mises sous traitement antiparasitaire, alors qu'actuellement ce traitement est administré de J5 jusqu'au résultat de l'inoculation du placenta aux souris.

Au début de ce travail, nous nous posions 3 questions :

1. *Aurait-on récupéré des diagnostics avec la PCR du placenta ?*

Non : aucun de nos 13 dossiers de toxoplasmose congénitale n'a été diagnostiqué uniquement sur la PCR. L'inoculation aux souris et la PCR ont dans notre étude une très bonne sensibilité, respectivement de 100% et 92,3%. Tous les diagnostics avaient été posés par l'inoculation du placenta.

2. *Aurait-on obtenu des diagnostics plus précoces grâce à l'analyse du placenta par PCR ?*

Oui : deux enfants ont été diagnostiqués peu après leur naissance grâce à la PCR effectuée sur le placenta. Ils ont ainsi été pris en charge plus tôt.

3. *Quelle pourrait être à l'avenir la place de la PCR dans le diagnostic néonatal par rapport à l'inoculation : viendrait-elle en remplacement ou s'ajouterait-elle à l'inoculation ?*

La PCR est une technique plus rapide que l'inoculation et permet un diagnostic plus précoce. Sa sensibilité est excellente. Son intérêt semble maximal pour les séroconversions de fin de grossesse, où l'amniocentèse n'est pas réalisée en général et où la maman n'a pas toujours eu le temps de recevoir un traitement antiparasitaire, traitement qui pourrait diminuer la sensibilité de la PCR. Dans ces cas, la PCR effectuée sur le placenta éviterait la mise en route d'un traitement antiparasitaire de 2 mois, administré en attendant les résultats de l'inoculation du placenta aux souris. Son excellente VPN permettrait d'affirmer l'enfant indemne de toute contamination en quelques jours.

Ainsi, la PCR pourrait être proposée systématiquement dans les cas de séroconversion de fin de grossesse en plus de l'inoculation aux souris.

Ses indications pourraient être étendues aux cas où **l'amniocentèse est revenue négative ou à ceux où elle n'a pas été réalisée (séroconversion après 26 SA ou en cas de refus de pratiquer l'amniocentèse de la part de la mère).**

En revanche, l'inoculation aux souris permet d'avoir les souches de *T.gondii* ce qui a un intérêt épidémiologique important. En effet, il existe pour la toxoplasmose un Centre de Ressources Biologiques à Reims et Limoges. Les souches obtenues dans les laboratoires hospitaliers leur sont systématiquement envoyées. Pour toutes ces raisons, il n'est pas envisagé d'arrêter cette technique à l'heure actuelle.

Dans l'idéal, il faut poursuivre les 2 techniques de PCR et d'inoculation du placenta en parallèle, dans les indications nommées ci-dessus. Néanmoins, le coût des 2 techniques doit être envisagé et comparé ; c'est un argument entrant toujours en jeu dans l'adoption d'une nouvelle technique de laboratoire. Une première évaluation grossière des 2 techniques a été réalisée :

- coût de la PCR correspondant à l'analyse d'1 placenta :

Elle a été estimée au laboratoire à 10 à 15 euros par analyse en coût de réactifs. A cela, il faut rajouter le « temps technicien » et le matériel, c'est à dire l'achat de l'automate de PCR, automate partagé entre les différents laboratoires de microbiologie. Ce coût est optimisable en travaillant en séries sur plusieurs échantillons à la fois.

- coût de l'inoculation d'un placenta :

- 10 souris sont inoculées avec 1 placenta : 20 euros.
- entretien des souris : 1 à 2 euros.
- ToxoScreen[®] pratiqué à 3 et 6 semaines : 350 euros les 192 tests. Or, pour 1 placenta, l'analyse sérologique d'1 souris nécessite 4 tests à chaque fois, soit 4 X 10 (10 souris inoculées par placenta) X 2 (ToxoScreen[®] fait à 3 et 6 semaines) soit 80 tests nécessaires pour 1 placenta, ce qui équivaut à 145 euros.

Le coût total de cette technique est aux alentours de 167 euros. Il faut ajouter le coût de la gestion de l'infrastructure de l'animalerie, non négligeable car devant répondre à des normes drastiques, et le « temps technicien. Enfin, signalons qu'en cas de positivité du ToxoScreen[®], la recherche de kystes cérébraux est indispensable, technique longue et nécessitant une certaine expérience de l'observateur (1 à 2 heures en moyenne).

CONCLUSION

Le diagnostic de la toxoplasmose congénitale repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. En vue d'optimiser le diagnostic en terme de sensibilité et de précocité, de nouvelles techniques sont régulièrement développées, en particulier avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire. Au CHU de Nantes, la PCR est utilisée pour l'analyse du placenta en parallèle de l'inoculation à la souris depuis environ 2 ans. Son évaluation, but de notre travail, a montré une bonne sensibilité et une bonne spécificité de la technique. Cela nous amène à penser que la PCR doit être poursuivie au sein du laboratoire en complément de l'inoculation dans certaines indications qui doivent être discutées avec les cliniciens :

- de manière systematique pour les séroconversion de fin de grossesse.
- de manière plus large dans les cas d'amniocentèse négative ou non réalisée (cas de séroconversion survenue après 26 SA).

La réalisation de ce travail rétrospectif a permis de mettre en évidence le manque de cohésion dans la prise en charge des enfants nés de mère ayant fait une séroconversion pergravidique. Cette étude a initié une réflexion entre les différents parasitologues du Réseau Sécurité Naissance- Naître Ensemble des Pays de la Loire. Cette réflexion a pour but de définir la manière d'optimiser le recueil des résultats, d'harmoniser les pratiques et de regrouper les données des différents centres dans l'objectif de constituer à terme des cohortes plus importantes, permettant alors une approche épidémiologique intéressante.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des recommandations pour la prévention de la toxoplasmose chez la femme enceinte (AFSSA 2005) :

Recommandations indispensables		Précisions
Hygiène personnelle	Se laver les mains : - surtout après avoir manipulé de la viande crue, des crudités souillées par de la terre ou avoir jardiné, - avant chaque repas.	Brossage des ongles recommandé.
Hygiène domestique	Porter des gants pour jardiner ou pour tout contact avec de la terre. Faire laver chaque jour, par une autre personne, le bac à litière du chat avec de l'eau bouillante, ou porter des gants.	Faire particulièrement attention aux jeunes chats, surtout s'ils chassent, et aux chats errants.
Hygiène alimentaire	Bien cuire tout type de viande (y compris la volaille et le gibier). En pratique, une viande bien cuite a un aspect extérieur doré, voire marron, avec un centre rose très clair, presque beige et ne laisse échapper aucun jus rosé. Lors de la préparation des repas, laver à grande eau les légumes et les plantes aromatiques, surtout s'ils sont terreux et consommés crus. Laver à grande eau les ustensiles de cuisine ainsi que les plans de travail.	Une viande bien cuite correspond à une température à cœur comprise entre 68 et 72°C. Eviter la cuisson des viandes au four à micro-ondes. Précautions particulièrement renforcées pour les végétaux constamment souillés par de la terre et consommés crus; radis, salade, fraises, champignons.
Recommandations complémentaires		Précisions
Congélation	La congélation des denrées d'origine animale à des températures inférieures à -18°C (surgélation) permet la destruction des kystes, et peut être proposée comme recommandation complémentaire de prévention.	
Repas en dehors du domicile	Ne consommer de viande que bien cuite. Eviter les crudités. Préférer les légumes cuits.	
Autres recommandations (relevant de la précaution)		Précisions
Aliments déconseillés	Lait de chèvre cru. Viande marinée, saumurée ou fumée. Huîtres, moules et autres mollusques consommés crus.	Risque exceptionnel mais avéré. Risque potentiel. Risque hypothétique à confirmer.

Annexe 2: lettre adressée aux patients, avec l'accord de ma directrice de thèse, le Dr Gay Andrieu.

Marjorie GAS, interne

Laboratoire de parasitologie-mycologie
CHU Nantes

1 place Alexis Ricordeau

44093 Nantes Cedex 1

02.40.08.40.79

06.81.02.99.23

mdrillon@hotmail.com

Nantes, le 27 décembre 2006

Madame, Monsieur,

Dans le cadre d'une étude sur la fiabilité d'une technique de biologie moléculaire pratiquée sur le placenta, nous sommes amenés à recontacter les mamans ayant fait une seroconversion de **toxoplasmose** durant leur grossesse, que nous avons suivies au laboratoire du CHU.

En effet, si votre placenta a été analysé, il a été adressé à Nantes dans notre laboratoire, car c'est une technique particulière, non disponible dans tous les hôpitaux de l'Ouest.

Afin de compléter tous nos dossiers, nous cherchons à récupérer les sérologies pratiquées sur votre bébé durant sa 1^{ère} année de vie et les examens cliniques faits par son médecin traitant.

Toutes ces données resteront bien sûr confidentielles et votre nom ne paraîtra dans aucun ouvrage divulgué.

Dans ce but, il nous faudrait contacter, avec votre permission, le pédiatre ou le généraliste suivant votre enfant pour qu'il nous transmette ces données.

Vous serait-il possible de nous adresser les coordonnées de ce médecin par courrier, téléphone ou e-mail (comme cela vous arrange) ?

En vous remerciant par avance pour ces renseignements,

Marjorie GAS
(interne de biologie médicale)

Annexe 3 : lettre adressée aux internes d'Angers.

Marjorie GAS
Interne parasitologie
CHU Nantes

Nantes, le 16/01/07

Portable : 06.81.02.99.23
mdrillon@hotmail.com
fax laboratoire de parasitologie : 02.40.08.42.49

A l'attention des internes du service de Parasitologie

Comme convenu avec Benjamin ce jour, je vous envoie les noms des patientes que je suis dans le cadre de ma thèse, suite à leur séroconversion de Toxoplasme pendant leur grossesse.

Le but de mon étude est de comparer les résultats de notre PCR pratiquée sur placenta avec la méthode de référence, l'inoculation aux souris, et de comparer ces résultats avec les sérologies de l'enfant jusqu'à ses 1 an, permettant de conclure quant à l'atteinte des bébés ou non. J'ai donc la délicate mission de retrouver ces enfants, de contacter leur pédiatre, pour récupérer les sérologies et le suivi clinique de leur 1^{ère} année de vie.

C'est là que je sollicite votre aide !

Nous avons reçu d'Angers pas mal de placentas mais malheureusement il me manque les coordonnées des patientes (adresse, tel), la date de séroconversion, voire le nom du pédiatre du bébé si par miracle vous l'aviez.....

Voilà....ci-dessous la liste des patientes.... Ce n'est pas urgent, mais si je pouvais avoir ces données dans les 2-3 semaines à venir, ce serait très bien.

(données supprimées dans un souci de confidentialité)

Merci d'avance....N'hésitez pas à m'appeler si vous voulez d'autres précisions, Marjorie

Annexes

Annexe 4 : Liste des informations nécessaires pour compléter les dossiers des enfants et statuer sur leur atteinte ou non.

<i>MAMAN</i>			<i>DOSSIER</i>	<i>ENFANT</i>		PLACENTA:PCR/Souris	Sang de cordon	MEDECIN	Hop
NOM	DATE SC	LA	DDN	clinique	suivi sero		souris Diagnostic		
1			06/01/2005			nég/nég			St Naz
2			12/01/2005			nég/nég			PCA
3			18/01/2005			pos(2 dépots/4)/nég			J.Verne
4			#20/01/05			pos/nég			Cholet
5			21/01/2005			pos(1/4)/pos(1/10)			Le Mans
6			21/01/2005			pos/pos			Cli st charles
7			#28/01/05			pos(1/2)/nég			Brétéché
8			23/02/2005			nég/nég			PCA
9			01/03/2005			nég/nég			St Naz
10			02/03/2005			nég/nég			Cholet
11			04/03/2005			pos/pos			CH la roche
12			14/03/2005			nég/nég			J.Verne
13			15/03/2005			nég/nég			cli JDP
14			15/03/2005			nég/nég			CH Lorient
15			#17/03/05			pos/pos			CH angers
16			19/03/2005			nég/nég			CH angers
17			27/03/2005			pos/pos			CH Mans
18			04/04/2005			nég/nég			CH angers
19			07/04/2005			pos/pos			
20			16/04/2005			nég/nég			PCA
21			14/04/2005			nég/nég			Le Mans
22			23/04/2005			nég/nég			J.Verne
23			23/04/2005			pos/pos			Challans
24			04/05/2005			nég/nég			St Naz
25			07/05/2005			nég/nég			CH cholet
26			18/05/2005			nég/nég			Brétéché
27			26/05/2005			pos/pos			PCA

Annexes

28		24/05/2005			nég/nég		PCA
29		28/05/2005			pos/pos		CH le mans
30		05/06/2005			nég/nég		cli St Charles
31		#4/06/05			pos/pos		CH angers
32		07/06/2005			nég/nég		CH St Naz
33		13/06/2005			nég/nég		PCA
34		16/06/2005			nég/nég		PCA
35		15/06/2005			nég/nég		Le Mans
36		18/06/05			<i>nég/nég</i>		<i>cli espérance</i>
37		22/06/2005			nég/nég		Brétéché
38		#26/06/05			nég/nég		CH angers
39		21/07/2005			nég/nég		Le Mans
40		24/07/2005			nég/nég		Le Mans
41		27/07/2005			nég/nég		
42		#29/07/05			<i>nég/nég</i>		<i>CH angers</i>
43		13/10/2005			pos/pos		
44		#21/10/05			pos/pos		<i>cli espérance</i>
45		03/11/2005			nég/nég		CH angers
46		07/11/2005			nég/nég		J.Verne
47		07/11/2005			nég/nég		Polycli du parc
48		18/11/2005			<i>nég/nég</i>		<i>CH Nord 2 Sèvres</i>
49		#22/11/05			<i>nég/nég</i>		<i>CH angers</i>
50		21/11/2005			nég/nég		Cli st charles
51		28/11/2005			nég/nég		CH angers
52		24/12/2005			nég/nég		<i>J.Verne</i>
53		04/01/2006			<i>nég/nég</i>		<i>J.Verne</i>
54		15/01/2006			nég/nég		Le Mans
55		19/01/2006			<i>nég/nég</i>		<i>CH Lorient</i>
56		#31/01/06			nég/nég		CH angers
57		29/01/2006			<i>nég/nég</i>		<i>CHU</i>

Annexes

58			#2/02/06			pos/pos			CH angers
59			06/02/2006			nég/nég			cli JDP(St Naz)
60			# 14/02/06			nég/nég			CH angers
61			16/02/2006			nég/nég			CH St Naz
62						nég/nég			CH angers
63			26/02/2006			nég/nég			CH angers
64			07/03/2006			<i>nég/nég</i>			<i>CH angers</i>
65			12/03/2006			nég/nég			CH angers
66			12/03/2006			nég/nég			LAM Segeral
67			14/03/2006			nég/nég			CH angers
68			28/03/2006			nég/nég			CH St Naz
69			30/03/2006			nég/nég			CHU
70			03/04/2006			<i>nég/nég</i>			<i>CHU</i>
71			02/04/2006			<i>nég/nég</i>			<i>CH St Naz</i>
72			15/04/06			nég/nég			Brétéché
73			13/05/2006			nég/nég			Brétéché
74			18/05/2006			pos/pos			CHU
75			# 23/05/06			nég/nég			CH angers
76			22/05/2006			nég/nég			Brétéché
77			26/05/2006			nég/nég			CHChallans
78			26/05/2006			nég/nég			CH angers
79			07/06/2006			<i>nég/nég</i>			<i>CH Lorient</i>
80			09/06/2006			<i>nég/nég</i>			<i>cli parc cholet</i>
81			13/06/2006			nég/pos			CHU 3112
82			14/06/2006			nég/nég			CH angers
83			17/06/2006			<i>nég/nég</i>			<i>CHU 3112</i>
84			27/06/2006			nég/nég			CH angers
85			30/06/2006			nég/nég			hop carhaix
86			06/07/2006			nég/nég			PCA

Annexe 5 : récapitulatif des 55 dossiers inclus dans notre étude (document de travail) :

En grisé, les dossiers positifs (atteinte congénitale des enfants) ; les autres dossiers correspondent à des enfants indemnes de toute atteinte (en gras, les dossiers incomplets inclus tout de même, en faveur d'anticorps maternels transmis).

	MAMAN			ENFANT		PLACENTA	cordon	
	DATE SC	LA	DDN	clinique	suivi sero	PCR/souris	souris	Diagnostic
2	début 2ème trimestre	?	12/01/2005	N	nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
3	4 mois grossesse (G)	nég	18/01/2005	tout: N	disparition Ac à 11 mois	pos(2 dépôts/4)/nég	nég	pas TC
4	dernier mois G	?	#20/01/05	N	sero nég à 1 an	pos/nég	/	pas TC
5 ???	2 mois G	nég	21/01/2005	N	manque à 1 an: en faveur AT	pos(1/4)/pos(1/10)	/	pas TC
9	tout début G	?	01/03/2005	va être fait	sérologie négative à 2 ans	nég/nég	nég	pas TC
11	fin dernier trimestre	pas fait	04/03/2005	OK	nég à naissance; + dès 2 mois	pos/pos	pos	TC
12	1er trimestre	nég	14/03/2005	OK	OK	nég/nég	pos(pas kystes)	pas TC
13	periconceptionnelle	?	15/03/2005	FO:N à 21 mois	sérologie nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
15	28SA	?	#17/03/05	infraclinique	sérologie + à naissance; IgG + à 1 an	pos/pos	/	TC
16	SC fin 1er trimestre	?	19/03/2005	?	IgG nég à 1 an	nég/nég	/	pas TC
17	3ème trimestre	pas fait	27/03/2005	N	sérologie + à naissance; manque après 2 mois	pos/pos	/	TC
18	pergravidique...	?	04/04/2005	?	que G+ à naissance; dim G à 3 mois	nég/nég	/	pas TC
19	dernier trimestre	POS	07/04/2005	OK	G et M + à naissance; G + à 16mois; rebond G à 2 ans	pos/pos	nég	TC
20	1er trimestre	?	16/04/2005	pas FO fait	sérologie nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
21	1er trimestre (8SA)	nég	14/04/2005	N	IgG nég à 4 mois	nég/nég	/	pas TC
22	dernier trimestre	?	23/04/2005	OK: N	sérologie nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
23	dernier trimestre	pas fait	23/04/2005	N (5 mois)	sérologie + dès naissance; rebond à 1 an	pos/pos	nég	TC
25	SC 20 SA	nég	07/05/2005	N à naissance	sérologie nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
26	début grossesse	?	18/05/2005	N	sérologie nég	nég/nég	nég	pas TC
27	dernier trimestre	pos	26/05/2005	?	sérologie + dès naissance et après 1 an	pos/pos	pos(pas kyste)	TC
28	dernier trimestre	nég	24/05/2005	N	sérologie nég à 2 ans	nég/nég	/	pas TC
29	15-16 SA	nég	28/05/2005	Chorioréтинite à 18 mois	sérologie tjs + à 1 an; rebond à 18 mois.	pos/pos	/	TC

Annexes

30	2ème trimestre	nég	05/06/2005	pas fait	disparition Ac maternels la 1ère année	nég/nég	nég	pas TC
31	SC fin 2ème trimestre		#4/06/05	asymptomatique	IgG + à 1 an	pos/pos	/	TC
32	début 2ème trimestre	?	07/06/2005	?	manque dernière sérologie des 1 an; dim IgG.	nég/nég	nég	pas TC
33	35 SA	?	13/06/2005	N	sérologie nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
34	fin 2ème trimestre	pos(PCR)	16/06/2005	N à 9 mois	que G à naissance; disp IgG à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
35	SC début G	?	15/06/2005	N à naissance	sérologie nég à 2 ans(pas contrôle avant)	nég/nég	/	pas TC
36	fin 1er trimestre	?	18/06/05	N	nég à 1 an	nég/nég	/	pas TC
39	12-14 SA	?	21/07/2005	N (1 an)	disparition Ac maternels à 1 an.	nég/nég	/	pas TC
42	5-10 SA	?	#29/07/05	?	IgG nég à 1 an	nég/nég	/	pas TC
43	20 SA	?	13/10/2005	N à 1 an	que G à naissance mais tjs + à 1 an.	pos/pos	/	TC
44	23-25 SA	?	#21/10/05	infraclinique	tout + à naissance; IgG tjs + à 1 an	pos/pos	/	TC
46	periconceptionnelle	nég	07/11/2005	??	disparition Ac maternels	nég/nég	nég	pas TC
48	5ème mois	?	18/11/2005	N à naissance	sérologie nég très vite (pas + de précisions)	nég/nég	/	pas TC
49	17-20 SA	?	#22/11/05	?	IgG nég à 1 an	nég/nég	/	pas TC
50	9ème SPC	?	21/11/2005	N à naissance	manque après 8 mois où traces d'IgG	nég/nég	pos(pas kyste)	pas TC
52	4ème SPC	nég	24/12/2005	N	nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
53	9-13 SA	nég	04/01/2006	N à naissance	sérologie nég à 9 mois	nég/nég	nég	pas TC
54	17-18 SA	nég	15/01/2006	N (à 3 mois)	manque après 3 mois; traces d'IgG encore.	nég/nég	/	pas TC
55	fin grossesse	?	19/01/2006	N	disparition IgG à 6 mois	nég/nég	/	pas TC
57	periconceptionnelle	?	29/01/2006	N à naissance	sérologie nég à 1 an	nég/nég	nég	pas TC
58	SC dernier trimestre	pas fait	#2/02/06	FO N à 9 mois	?? à naissance; G tjs + à 9 mois, M et A nég	pos/pos	/	TC
61	anteconceptionnelle	?	16/02/2006	N (à 9 mois)	pas suivi régulier. CT à 17 mois: négatif	nég/nég	/	pas TC
64	?	?	07/03/2006	?	IgG nég à 1 an	nég/nég	/	pas TC
69	anteconceptionnelle	?	30/03/2006	N à naissance	manque après 3 mois; traces d'IgG encore.	nég/nég	/	pas TC
70	pergestationnelle...	?	03/04/2006	N à naissance	A jour : nég à 10 mois	nég/nég	/	pas TC
71	14ème SPC	?	02/04/2006	N à naissance	rien après 6 mois (encore traces IgG)	nég/nég	/	pas TC
74	32-33 SA	pos	18/05/2006	N	sérologie + dès naissance; rebond à 7 mois	pos/pos	pos	TC
79	fin grossesse	?	07/06/2006	N à naissance	disparition Ac maternels	nég/nég	nég	pas TC
80	4mois1/2	?	09/06/2006	N	disparition Ac à 11 mois	nég/nég	/	pas TC
81	36 SA	pas fait	13/06/2006	N à naissance	IgG tjs + à 1 an	nég/pos	nég	TC
83	2ème SPC	?	17/06/2006	N à naissance	disparition Ac maternels à 9 mois	nég/nég	/	pas TC
86	periconceptionnelle	?	06/07/2006	N à naissance	traces d'IgG à 9 mois, M et A nég.	nég/nég	nég	pas TC

MERE	NOM :	Médecin traitant :
	PRENOM :	Gynécologue :
	DDN :	Laboratoire :
	DDR :	

Histoire sérologique

N°demande					
Date					
AXSYM	G				
	M				
VIDAS	G				
	M				
Isaga					
Avidité					
IgA					

Diagnostic anténatal	Diagnostic néonatal
-----------------------------	----------------------------

<p style="text-align: center;"><u>Liquide amniotique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • PCR • Inoculation à la souris : <ul style="list-style-type: none"> -3^{ème}.sem -6^{ème}.sem <p style="text-align: center;"><u>Echographie</u></p>	<p style="text-align: center;"><u>Placenta</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • PCR • Inoculation à la souris <ul style="list-style-type: none"> -3^{ème} sem -6^{ème}.sem <p style="text-align: center;"><u>Sang de cordon</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Inoculation à la souris <ul style="list-style-type: none"> -3^{ème} sem -6^{ème} sem • Sérologies <ul style="list-style-type: none"> - IgG - IgA - IgM - WB
---	---

Diagnostic

ENFANT	NOM : PRENOM : DDN :	DIAGNOSTIC :	PEDIATRE :																																													
	<p><u>Bilan néonatal :</u></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 15%;">N° demande</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 15%;"></td> <td style="width: 15%;"></td> <td style="width: 15%;"></td> <td style="width: 15%;"></td> </tr> <tr> <td>Date</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">AXSYM</td> <td>G</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>M</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">VIDAS</td> <td>G</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>M</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Isaga</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>IgA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p><u>Renseignements cliniques divers :</u></p>			N° demande						Date						AXSYM	G					M					VIDAS	G					M					Isaga						IgA				
N° demande																																																
Date																																																
AXSYM	G																																															
	M																																															
VIDAS	G																																															
	M																																															
Isaga																																																
IgA																																																

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbasi, M., K. Kowalewska-Grochowska, et coll. (2003). "Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*." J Infect Dis **188**(4): 608-16.
- Abboud, P., G. Harika, et coll. (1995). "[Ultrasonic signs of fetal toxoplasmosis. Review of the literature]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **24**(7): 733-8.
- AFSSA (2005). "Toxoplasmose: état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation."
- ameziane, n. (2005). "Principes de biologie moléculaire en biologie clinique." campus reference, elsevier.
- Anonyme (1996). "Recommandations pour la prévention de la séroconversion toxoplasmique chez les femmes enceintes." BEH: 16-75.
- Antsaklis, A., G. Daskalakis, et coll. (2002). "Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis." Prenat Diagn **22**(12): 1107-11.
- Aspinall (2003). "Molecular evidence for multiple *T.gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications." Int J Parasitol **33**: 97-103.
- Aspöck, H. (2003). "Prevention of congenital toxoplasmosis in Austria." Arch Pediatr **10 Suppl 1**: 16-7.
- Barbier, D., T. Ancelle, et coll. (1983). "Seroepidemiological survey of toxoplasmosis in La Guadeloupe, French West Indies." Am J Trop Med Hyg **32**(5): 935-42.
- Bastien, P. (2002). "Molecular diagnosis of toxoplasmosis." Trans R Soc Trop Med Hyg **96 Suppl 1**: S205-15.
- Bastien, P., E. Jumas-Bilak, et coll. (2007). "Three years of multi-laboratory external quality control for the molecular detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid in France." Clin Microbiol Infect **13**(4): 430-3.
- Berrebi, A., M. Bardou, et coll. (2006). "Outcome for children infected with congenital toxoplasmosis in the first trimester and with normal ultrasound findings: A study of 36 cases." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.
- Bessieres, M. H., A. Berrebi, et coll. (2001). "Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **94**(1): 37-45.
- Bessieres, M. H., C. Roques, et coll. (1992). "IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis." J Clin Pathol **45**(7): 605-8.
- Binquet, C., M. Wallon, et coll. (2003). "Prognostic factors for the long-term development of ocular lesions in 327 children with congenital toxoplasmosis." Epidemiol Infect **131**(3): 1157-68.
- Black, M. W. and J. C. Boothroyd (2000). "Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 607-23.
- Bretagne, S. (2003). "Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays." Clin Microbiol Infect **9**(6): 505-11.
- Brezin, A. P., P. Thulliez, et coll. (2003). "Ophthalmic outcomes after prenatal and postnatal treatment of congenital toxoplasmosis." Am J Ophthalmol **135**(6): 779-84.
- Buffolano, W. (2003). "Failure to implement a preventive strategy against congenital toxoplasmosis in Italy." Arch Pediatr **10 Suppl 1**: 21-2.
- Chabbert, E., L. Lachaud, et coll. (2004). "Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of toxoplasma in amniotic fluid, blood, and tissues." J Clin Microbiol **42**(4): 1719-22.

- Chemla, C., I. Villena, et coll. (2002). "Preconception seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis." Clin Diagn Lab Immunol **9**(2): 489-90.
- Cimon (2002). "Comment résoudre les difficultés du sérologiediagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte?" Immuno-analyse et Biologie spécialisée. **17**: 143-147.
- Costa, J. M., P. Ernault, et coll. (2001). "Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes." Prenat Diagn **21**(2): 85-8.
- Couvreur, J. (1993). "Toxoplasmose congénitale. Prise en charge et devenir." Med Mal Infect **23**: 176-182.
- Couvreur, J. (1999). "[Problems of congenital toxoplasmosis. Evolution over four decades]." Presse Med **28**(14): 753-7.
- Couvreur, J., G. Desmots, et coll. (1984). "[A homogeneous series of 210 cases of congenital toxoplasmosis in 0 to 11-month-old infants detected prospectively]." Ann Pediatr (Paris) **31**(10): 815-9.
- Daffos, F., F. Forestier, et coll. (1988). "Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis." N Engl J Med **318**(5): 271-5.
- Dao, A., B. Fortier, et coll. (2001). "Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype." Int J Parasitol **31**(1): 63-5.
- Darde, M. L. (1996). "Biodiversity in *Toxoplasma gondii*." Curr Top Microbiol Immunol **219**: 27-41.
- Derouin, F. (2002). "La toxoplasmose chez l'homme: diagnostic, prévention et traitement." Supplément au Laborama n°35 **35**.
- Derouin, F. and M. Santillana-Hayat (2000). "Anti-toxoplasma activities of antiretroviral drugs and interactions with pyrimethamine and sulfadiazine in vitro." Antimicrob Agents Chemother **44**(9): 2575-7.
- Desmots, G. and J. Couvreur (1974). "[Isolation of the parasite in congenital toxoplasmosis: its practical and theoretical importance]." Arch Fr Pediatr **31**(2): 157-66.
- Desmots, G. and J. Couvreur (1984). "[Natural history of congenital toxoplasmosis]." Ann Pediatr (Paris) **31**(10): 799-802.
- Desmots, G., J. Couvreur, et coll. (1990). "[Congenital toxoplasmosis. 5 cases of mother-to-child transmission of pre-pregnancy infection]." Presse Med **19**(31): 1445-9.
- Desmots, G., Y. Naot, et coll. (1981). "Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections." J Clin Microbiol **14**(5): 486-91.
- Douche, C., A. Benabdesselam, et coll. (1996). "[Value of prevention of congenital toxoplasmosis]." J Fr Ophtalmol **19**(5): 330-4.
- Dubey, J. P. (1987). "Toxoplasmosis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **17**(6): 1389-404.
- Dubey, J. P. (1988). "Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork." Am J Vet Res **49**(6): 910-3.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay, et coll. (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." Clin Microbiol Rev **11**(2): 267-99.
- Dubey, J. P., N. L. Miller, et coll. (1970). "The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces." J Exp Med **132**(4): 636-62.
- Dunn, D., M. Wallon, et coll. (1999). "Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling." Lancet **353**(9167): 1829-33.
- Edvinsson, B., M. Lappalainen, et coll. (2006). "Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis." Clin Microbiol Infect **12**(2): 131-6.

- Evans (1992). "Life cycle and animal infection." Human toxoplasmosis: 26-55.
- Ferguson, D. J., A. Birch-Andersen, et coll. (1978). "Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*." Acta Pathol Microbiol Scand [B] **86B**(3): 165-7.
- Fernandez, F., G. Ouvina, et coll. (1995). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina, 1993." Vet Parasitol **59**(1): 75-9.
- Ferret, N., P. Marty, et coll. (2003). "[Clinical management of congenital toxoplasmosis]." Arch Pediatr **10 Suppl 1**: 42-4.
- Ferro, E. A., D. A. Silva, et coll. (2002). "Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis." Infect Immun **70**(12): 7089-94.
- Filiseti, D., M. Gorcii, et coll. (2003). "Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR." J Clin Microbiol **41**(10): 4826-8.
- Fortier, B., C. Coignard-Chatain, et coll. (1997). "[Study of developing clinical outbreak and serological rebounds in children with congenital toxoplasmosis and follow-up during the first 2 years of life]." Arch Pediatr **4**(10): 940-6.
- Foudrinier, F., I. Villena, et coll. (2003). "Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis." J Clin Microbiol **41**(4): 1681-6.
- Foulon, W., J. M. Pinon, et coll. (1999). "Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters." Am J Obstet Gynecol **181**(4): 843-7.
- Foulon, W., I. Villena, et coll. (1999). "Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year." Am J Obstet Gynecol **180**(2 Pt 1): 410-5.
- Fricker-Hidalgo, H. (2005). "Placenta: intérêt de la recherche de toxoplasmes et comparaison avec les autres techniques de diagnostic de la toxoplasmosis congénitale." Congrès de la Société Française de Parasitologie.
- Fricker-Hidalgo, H., M. P. Brenier-Pinchart, et coll. (2007). "Value of *Toxoplasma Gondii* Detection in One Hundred Thirty-Three Placentas for the Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis." Pediatr Infect Dis J **26**(9): 845-846.
- Fricker-Hidalgo, H., H. Pelloux, et coll. (1996). "Congenital toxoplasmosis: specific IgM in fetal blood, cord blood and in the newborn." Ann Biol Clin (Paris) **54**(3-4): 165-8.
- Fricker-Hidalgo, H., H. Pelloux, et coll. (1998). "Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo, and in vitro cultures." Placenta **19**(7): 545-9.
- Fricker-Hidalgo, H., C. Saddoux, et coll. (2006). "New Vidas assay for *Toxoplasma*-specific IgG avidity: evaluation on 603 sera." Diagn Microbiol Infect Dis **56**(2): 167-72.
- Gilbert, R., D. Dunn, et coll. (2001). "Ecological comparison of the risks of mother-to-child transmission and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis according to prenatal treatment protocol." Epidemiol Infect **127**(1): 113-20.
- Gilbert, R. E., L. Gras, et coll. (2001). "Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France." Int J Epidemiol **30**(6): 1303-8.
- Giordano, L. F., E. P. Lasmar, et coll. (2002). "Toxoplasmosis transmitted via kidney allograft: case report and review." Transplant Proc **34**(2): 498-9.
- Glazer, A. N. and R. A. Mathies (1997). "Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses." Curr Opin Biotechnol **8**(1): 94-102.

- Gras, L., R. E. Gilbert, et coll. (2001). "Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis." Int J Epidemiol **30**(6): 1309-13.
- Gras, L., R. E. Gilbert, et coll. (2004). "Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies." Epidemiol Infect **132**(3): 541-8.
- Gras, L., M. Wallon, et coll. (2005). "Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres." Acta Paediatr **94**(12): 1721-31.
- Grover, C. M., P. Thulliez, et coll. (1990). "Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid." J Clin Microbiol **28**(10): 2297-301.
- Guy, E. C., H. Pelloux, et coll. (1996). "Interlaboratory comparison of polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA added to samples of amniotic fluid." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **15**(10): 836-9.
- Hohlfeld, P., J. MacAleese, et coll. (1991). "Fetal toxoplasmosis: ultrasonographic signs." Ultrasound Obstet Gynecol **1**(4): 241-4.
- Holliman, R. (1995). "Maternal infections. Part 1: Toxoplasmosis." Mod Midwife **5**(12): 22-6.
- Homan, W. L., M. Vercammen, et coll. (2000). "Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR." Int J Parasitol **30**(1): 69-75.
- Jacquemard, F. (2003). "[Ultrasonographic signs of congenital toxoplasmosis]." Arch Pediatr **10 Suppl 1**: 35-8.
- Janitschke, K. (2003). "Official recommendations and strategy for prevention of congenital toxoplasmosis in Germany." Arch Pediatr **10 Suppl 1**: 15.
- Kaiser, K., A. M. Van Loon, et coll. (2007). "Multicenter proficiency study for detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid by nucleic acid amplification methods." Clin Chim Acta **375**(1-2): 99-103.
- Kieffer, F., P. Thulliez, et coll. (2002). "[Treatment of subclinical congenital toxoplasmosis by sulfadiazine and pyrimethamine continuously during 1 year: apropos of 46 cases]." Arch Pediatr **9**(1): 7-13.
- Konishi, E. (1993). "Naturally occurring antibodies that react with protozoan parasites." Parasitol Today **9**(10): 361-4.
- Lappalainen, M. (2003). "Current situation regarding toxoplasmosis in Finland." Arch Pediatr **10 Suppl 1**: 19.
- Lappalainen, M. and K. Hedman (2004). "Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity." Ann Ist Super Sanita **40**(1): 81-8.
- Liesenfeld, O., C. Press, et coll. (1997). "False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test." J Clin Microbiol **35**(1): 174-8.
- Lin, M. H., T. C. Chen, et coll. (2000). "Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*." J Clin Microbiol **38**(11): 4121-5.
- Luft, B. J., R. Hafner, et coll. (1993). "Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team." N Engl J Med **329**(14): 995-1000.
- Marty, P., Y. Le Fichoux, et coll. (1991). "[Congenital toxoplasmosis and preconceptional maternal ganglionic toxoplasmosis]." Presse Med **20**(8): 387.
- Maubon, D., M. P. Brenier-Pinchart, et coll. (2007). "[Real-time PCR in the diagnosis of toxoplasmosis: the way to standardisation?]." Pathol Biol (Paris).

- McAuley, J., K. M. Boyer, et coll. (1994). "Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial." *Clin Infect Dis* **18**(1): 38-72.
- McLeod, R., K. Boyer, et coll. (2006). "Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study." *Clin Infect Dis* **42**(10): 1383-94.
- Montoya, J. G., L. F. Giraldo, et coll. (2001). "Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center." *Clin Infect Dis* **33**(5): 629-40.
- Montoya, J. G., O. Liesenfeld, et coll. (2002). "VIDAS test for avidity of Toxoplasma-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women." *J Clin Microbiol* **40**(7): 2504-8.
- Morin, O. (2002). "Diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale. Apport des nouvelles techniques de diagnostic." *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*. **17**: 231-237.
- Naessens, A. (2003). "Screening for toxoplasmosis during pregnancy: the situation in Belgium." *Arch Pediatr* **10 Suppl 1**: 18.
- Naessens, A., P. A. Jenum, et coll. (1999). "Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation." *J Pediatr* **135**(6): 714-9.
- Nelson, J. C., D. J. Kauffmann, et coll. (1989). "Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions." *Ann Ophthalmol* **21**(7): 253-4.
- Patel, D. V., E. M. Holfels, et coll. (1996). "Resolution of intracranial calcifications in infants with treated congenital toxoplasmosis." *Radiology* **199**(2): 433-40.
- Pelloux, H., H. Fricker-Hidalgo, et coll. (2002). "[Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate]." *Arch Pediatr* **9**(2): 206-12.
- Pelloux, H., E. Guy, et coll. (1998). "A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams." *FEMS Microbiol Lett* **165**(2): 231-7.
- Pelloux, H., J. Weiss, et coll. (1996). "A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction." *FEMS Microbiol Lett* **138**(1): 11-5.
- Petersen, E. (2007). "Toxoplasmosis." *Semin Fetal Neonatal Med* **12**(3): 214-23.
- Petersen, E. and D. R. Schmidt (2003). "Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options?" *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**(1): 175-82.
- Pettersen, E. K. (1979). "Destruction of *Toxoplasma gondii* by HCl solution." *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* **87**(4): 217-20.
- Peyron, F., J. R. Lobry, et coll. (2006). "Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America)." *Microbes Infect* **8**(9-10): 2333-40.
- Peyron, F., M. Wallon, et coll. (1996). "Long-term follow-up of patients with congenital ocular toxoplasmosis." *N Engl J Med* **334**(15): 993-4.
- Pinon, J. M., H. Dumon, et coll. (2001). "Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies." *J Clin Microbiol* **39**(6): 2267-71.
- Press, C., J. G. Montoya, et coll. (2005). "Use of a single serum sample for diagnosis of acute toxoplasmosis in pregnant women and other adults." *J Clin Microbiol* **43**(7): 3481-3.
- Priet, A. (2003). "Apport de la PCR en temps réel dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose: mise en place de la technique au laboratoire de parasitologie de Nantes." Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie.

- Raffi, F., J. P. Aboulker, et coll. (1997). "A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. The BIOTOXO Study Group." Aids **11**(2): 177-84.
- Raffi, F., M. Tiab, et coll. (1992). "[Cerebral toxoplasmosis concomitant with primary toxoplasma infection in AIDS]." Presse Med **21**(12): 584-5.
- Reischl, U., S. Bretagne, et coll. (2003). "Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes." BMC Infect Dis **3**: 7.
- Remington, J. S. and E. N. Cavanaugh (1965). "Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain." N Engl J Med **273**(24): 1308-10.
- Remington, J. S., P. Thulliez, et coll. (2004). "Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis." J Clin Microbiol **42**(3): 941-5.
- Réseau (2006). "Recommandation pour la prévention et la prise en charge de la toxoplasmose per-gravidique et post-natale." Réseau Sécurité Naissance-Naître ensemble-Pays de la Loire.
- Rilling, V., K. Dietz, et coll. (2003). "Evaluation of a commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22**(3): 174-80.
- Robert-Gangneux, F., V. Commerce, et coll. (1999). "Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **18**(9): 648-54.
- Robert-Gangneux, F., M. F. Gavinet, et coll. (1999). "Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases." J Clin Microbiol **37**(9): 2893-8.
- Roberts, A., K. Hedman, et coll. (2001). "Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **20**(7): 467-74.
- Roberts, F. and R. McLeod (1999). "Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis." Parasitol Today **15**(2): 51-7.
- Roizen, N., C. N. Swisher, et coll. (1995). "Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis." Pediatrics **95**(1): 11-20.
- Romand, S., M. Chosson, et coll. (2004). "Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*." Am J Obstet Gynecol **190**(3): 797-802.
- Romand S, J. F., Nobre R, Thulliez P. (1998). "Toxoplasmose et grossesse." Médecine thérapeutique/Pédiatrie. **1**(numéro 6): 481-8.
- Romand, S., M. Wallon, et coll. (2001). "Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis." Obstet Gynecol **97**(2): 296-300.
- Rorman, E., C. S. Zamir, et coll. (2006). "Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection." Reprod Toxicol **21**(4): 458-72.
- Roux, C., G. Desmots, et coll. (1975). "[Prevention of congenital toxoplasmosis. Results at the maternity department of the Hopital Saint-Antoine in 1972]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **4**(4): 557-69.
- Schmidt, D. R., B. Høgh, et coll. (2006). "The national neonatal screening programme for congenital toxoplasmosis in Denmark: results from the initial four years, 1999-2002." Arch Dis Child **91**(8): 661-5.
- Sibley, L. D. (2003). "*Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style." Traffic **4**(9): 581-6.
- SYROCOT, T. (2007). "Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data." The Lancet. **vol 369**.

- Tanyuksel, M., C. Guney, et coll. (2004). "Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis." *J Microbiol* **42**(3): 211-5.
- Tenter, A. M., A. R. Heckeroth, et coll. (2000). "Toxoplasma gondii: from animals to humans." *Int J Parasitol* **30**(12-13): 1217-58.
- Thalib, L., L. Gras, et coll. (2005). "Prediction of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid." *Bjog* **112**(5): 567-74.
- Thiebaugeorges, O. and M. Schweitzer (2003). "[Prevention of congenital toxoplasmosis: official recommendations and management in France]." *Arch Pediatr* **10 Suppl 1**: 20.
- Thiebaut, R., S. Leproust, et coll. (2007). "Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data." *Lancet* **369**(9556): 115-22.
- Tissot Dupont, D., H. Fricker-Hidalgo, et coll. (2003). "Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**(2): 122-5.
- Torres, R. A., W. Weinberg, et coll. (1997). "Atovaquone for salvage treatment and suppression of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Atovaquone/Toxoplasmic Encephalitis Study Group." *Clin Infect Dis* **24**(3): 422-9.
- Villena, I., D. Aubert, et coll. (1998). "Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group." *Scand J Infect Dis* **30**(3): 295-300.
- Villena, I., C. Chemla, et coll. (1998). "Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. Reims Toxoplasmosis Group." *Prenat Diagn* **18**(10): 1079-81.
- Wallon, M., G. Cozon, et coll. (2001). "Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children." *Eur J Pediatr* **160**(9): 534-40.
- Wallon, M., P. Gaucherand, et coll. (2002). "[Toxoplasma infections in early pregnancy: consequences and management]." *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **31**(5): 478-84.
- Wallon, M., L. Kodjikian, et coll. (2004). "Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis." *Pediatrics* **113**(6): 1567-72.
- Wallon, M., C. Liou, et coll. (1999). "Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy." *Bmj* **318**(7197): 1511-4.
- Wirten, M., F. Botterel, et coll. (1999). "[Significance of post-partum diagnosis of congenital toxoplasmosis primary maternal infection at the end of the pregnancy]." *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **28**(6): 566-7.
- Yuksel, D., E. Van Acker, et coll. (1999). "[Congenital toxoplasmosis: presentation of a case]." *Bull Soc Belge Ophtalmol* **274**: 21-6.

Nom- Prénoms : DRILLON-CHARPENTIER Marjorie, Marlène

Titre de la Thèse : PLACE DE LA PCR EFFECTUEE SUR LE PLACENTA DANS LE DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE : ETUDE DE 86 CAS DE SEROCONVERSIONS PERGRAVIDIQUES

Résumé de la Thèse :

Le diagnostic biologique néonatal de la toxoplasmose congénitale combine des techniques indirectes sérologiques et des techniques directes d'analyse du placenta et du sang de cordon à la recherche de *T.gondii*. L'inoculation aux souris est une méthode spécifique, assez sensible mais longue. La PCR pourrait être proposée en complément pour améliorer la sensibilité du diagnostic néonatal. Notre étude a montré une très bonne sensibilité de la PCR et une spécificité meilleure que dans de nombreuses études. La rapidité d'obtention de ses résultats a permis de poser le diagnostic de TC plus précocement dans 2 cas sur nos 13 cas de TC avérés. De plus, bénéficiant d'une excellente valeur prédictive négative, la PCR pourrait être d'une grande utilité dans le diagnostic néonatal en excluant l'atteinte congénitale chez bon nombre de nouveaux-nés qui pourraient ainsi ne pas être traités. Il ressort aussi de notre travail la grande difficulté à reconstituer de façon rétrospective les dossiers mère/enfant suite à une séroconversion pergravidique. Une réflexion doit être entreprise pour centraliser les données mère/enfant et compléter le dossier au fur et à mesure de l'avancée de la grossesse puis de la vie de l'enfant.

MOTS CLES : TOXOPLASMOSE CONGENITALE / DIAGNOSTIC NEONATAL / PLACENTA / PCR / INOCULATION AUX SOURIS

Adresse de l'auteur : 8, rue de la Brissaudière, 44690 LA HAYE FOUASSIERE