

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2003

N° 42

**THESE POUR LE DIPLOME D ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
MEMOIRE D ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Anthony PRIET

Soutenu le 19 septembre 2003

**Apport de la PCR en temps réel dans le diagnostic
anténatal de la toxoplasmose**

SOMMAIRE

PARTIE I : GENERALITES

9

Premier chapitre : Toxoplasme et toxoplasmose 10

INTRODUCTION..... 11

I – HISTORIQUE 11

II – LE PARASITE 12

II.1 – Taxonomie 12

II.2 – Morphologie 13

II.2.1 – Le tachyzoïte..... 13

II.2.2 – Kyste et bradyzoïte 15

II.2.3 – Oocyste..... 18

II.3 – Génome et structure biochimique du parasite..... 18

II.4 – Cycle évolutif du parasite et modes de contamination de l'homme..... 20

II.4.1 – Cycle évolutif..... 20

II.4.1.1 – Evolution chez l'hôte définitif : le chat (cycle entéro-épithélial) 20

II.4.1.2 – Evolution chez les hôtes intermédiaires 21

II.4.2 – Modes de contamination de l'homme 23

II.4.2.1 – A partir de kystes..... 23

II.4.2.2 – A partir d'oocystes..... 23

II.4.2.3 – A partir des tachyzoïtes..... 23

III – ASPECTS CLINIQUES DE LA TOXOPLASMOSE..... 24

<u>III.1 – La toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent</u>	24
<u>III.1.1 – La forme asymptomatique</u>	24
<u>III.1.2 – La toxoplasmose aiguë bénigne</u>	24
<u>III.2 – La toxoplasmose congénitale</u>	25
<u>III.2.1 – Contamination du 1^{er} trimestre de grossesse</u>	25
<u>III.2.2 – Contamination du 2^{ème} et du 3^{ème} trimestre de grossesse</u>	26
<u>III.2.2.1 – Les formes viscérales</u>	26
<u>III.2.2.2 – Les formes dégradées ou retardées</u>	26
<u>III.2.3 – Les formes inapparentes ou infra-cliniques</u>	26
<u>III.3 – La toxoplasmose de l’immunodéprimé</u>	26
<u>III.3.1 – La toxoplasmose et le VIH</u>	26
<u>III.3.2 – Toxoplasmose et transplantation</u>	27
 <i><u>Deuxième chapitre : La toxoplasmose congénitale</u></i>	28
 <u>I – DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES</u>	29
<u>I.1 – Répartition géographique de la toxoplasmose</u>	29
<u>I.2 – Séroprévalence chez la femme enceinte</u>	29
<u>I.3 – Taux de séroconversion au cours de la grossesse</u>	30
<u>I.4 – Prévalence de la toxoplasmose congénitale</u>	31
 <u>II – PHYSIOPATHOLOGIE DE L’ATTEINTE FŒTALE</u>	31
<u>II.1 – La transmission materno-fœtale : rôle du placenta</u>	31
<u>II.2 – Risque d’infection fœtale</u>	34
 <u>III – PREVENTION PRIMAIRE DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE</u>	36

<u>III.1 – Le dépistage et la surveillance sérologique</u>	36
<u>III.1.1 – Les techniques sérologiques</u>	37
<u>III.1.1.1 – Les techniques utilisant les antigènes figurés</u>	37
<u>III.1.1.2 – Les techniques utilisant les antigènes solubles</u>	39
<u>III.1.2 – Cinétique des anticorps au cours d’une séroconversion</u>	40
<u>III.1.2.1 – Les IgM</u>	40
<u>III.1.2.2 – Les IgG</u>	40
<u>III.1.2.3 – Les autres isotypes</u>	41
<u>III.1.3 – Interprétation de la sérologie maternelle</u>	42
<u>III.1.3.1 – L’absence d’IgG et l’absence d’IgM</u>	43
<u>III.1.3.2 – La présence d’IgG et l’absence d’IgM</u>	43
<u>III.1.3.3 – L’absence d’IgG et la présence d’IgM</u>	44
<u>III.1.3.4 – La présence d’IgG et la présence d’IgM</u>	44
<u>III.2 – Les mesures hygiéno-diététiques</u>	46
<u>IV – PREVENTION SECONDAIRE DE LA TOXOPLASMOSE</u>	47
<u>IV.1 – Prise en charge d’une séroconversion maternelle</u>	48
<u>IV.2 – Le diagnostic anténatal</u>	49
<u>IV.2.1 – Le suivi échographique</u>	50
<u>IV.2.2 – Le diagnostic biologique</u>	50
<u>IV.2.2.1 – Prélèvement de liquide amniotique</u>	50
<u>IV.2.2.2 – L’inoculation à l’animal</u>	51
<u>IV.2.2.3 – Les cultures cellulaires</u>	51
<u>IV.2.2.4 – La PCR ou Polymerase Chain Reaction</u>	51
<u>IV.2.3 – Conséquence thérapeutique du diagnostic anténatal</u>	54

<u>IV.3 – Le bilan néonatal</u>	54
<u>IV.3.1 – Examen clinique</u>	55
<u>IV.3.2 – L'imagerie cérébrale</u>	55
<u>IV.3.3 – Le diagnostic biologique néonatal</u>	55
<u>IV.3.3.1 – Diagnostic parasitologique</u>	55
<u>IV.3.3.2 – Diagnostic sérologique</u>	56
<u>IV.3.4 – Le traitement et le suivi postnatal</u>	58
<u>IV.3.4.1 – Infection congénitale non prouvée à la naissance</u>	58
<u>IV.3.4.2 – Toxoplasmose congénitale certaine</u>	58
<u>Troisième chapitre : La PCR en temps réel</u>	60
<u>INTRODUCTION</u>	61
<u>I – PRINCIPE</u>	62
<u>I.1 – Rappels sur la PCR</u>	62
<u>I.2 – Les technologies de la PCR en temps réel</u>	63
<u>I.2.1 – Technologie utilisant les sondes</u>	63
<u>I.2.1.1 – Méthode TaqMan</u>	63
<u>I.2.1.2 – Le test d'hybridation (sondes LightCycler)</u>	63
<u>I.2.1.3 – Les sondes beacon</u>	64
<u>I.2.2 – Technologie utilisant les intercalants</u>	64
<u>II – APPAREILLAGE</u>	65
<u>II.1 – Les systèmes</u>	65
<u>II.2 – Thermocycleur et module de détection</u>	66
<u>III – PRESENTATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS</u>	67

<u>IV – LES APPLICATIONS DE LA PCR EN TEMPS REEL</u>	69
<u>IV.1 – La microbiologie clinique</u>	69
<u>IV.2 – Oncologie clinique</u>	70
<u>IV.3 – Expression génique</u>	70

<u>PARTIE II : APPLICATION DE LA PCR EN TEMPS REEL DANS LE DIAGNOSTIC ANTENATAL DE LA TOXOPLASMOSE AU LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE DE NANTES</u>	71
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<u>INTRODUCTION</u>	72
----------------------------------	----

<u>I – MISE AU POINT DE LA PCR EN TEMPS REEL DANS LE DIAGNOSTIC ANTENATAL DE LA TOXOPLASMOSE</u>	74
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<u>I.1 – Matériels et méthodes</u>	74
<u>I.1.1 – Sources d’ADN</u>	74
<u>I.1.2 – Extraction de l’ADN</u>	75
<u>I.1.3 – Techniques d’amplification génique utilisées au laboratoire de parasitologie</u>	75
<u>I.1.3.1 – La simple PCR</u>	75
<u>I.1.3.2 – La PCR-DEIA (DNA Enzyme ImmunoAssay)</u>	75
<u>I.1.4 – Principe de la méthode TaqMan</u>	76
<u>I.1.5 – Conditions de la réaction de PCR en temps réel</u>	79
<u>I.1.5.1 – Les amorces et la sonde TaqMan</u>	79
<u>I.1.5.2 – La Taq polymérase</u>	81
<u>I.1.5.3 – Les désoxyribonucléotides triphosphates</u>	81
<u>I.1.5.4 – Le tampon 10X</u>	81
<u>I.1.5.5 – MgCl₂</u>	82
<u>I.1.5.6 – Automatisation et cycle de température</u>	82

<u>I.2 – Résultats</u>	82
<u>I.2.1 – Optimisation des paramètres de la réaction de PCR en temps réel</u> ...	82
<u>I.2.1.1 – Détermination de la température optimale d’hybridation et d’élargissement</u>	83
<u>I.2.1.2 – Détermination de la concentration optimale en MgCl₂</u>	84
<u>I.2.2 – Application de la PCR en temps réel aux liquides amniotiques selon le protocole initial.</u>	85
<u>I.2.2.1 – Résultats</u>	85
<u>I.2.2.2 – Conclusion</u>	86
<u>I.2.3 – Optimisation de la technique</u>	88
<u>I.2.3.1 – L’étape d’extraction</u>	88
<u>I.2.3.2 – Introduction d’un contrôle positif interne</u>	90
<u>I.2.4 – Efficacité de la PCR en temps réel</u>	92
<u>I.2.5 – Sensibilité de la PCR en temps réel sur des dilutions de toxoplasmes en eau physiologique.</u>	92
<u>I.2.6 – Spécificité de la PCR en temps réel</u>	96
<u>I.2.7 – Application de la PCR en temps réel aux liquides amniotiques selon le protocole définitif.</u>	99
<u>II – DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	104

<u>ANNEXE I : Schéma du mécanisme de fluorescence des sondes <i>beacon</i> (sondes conformationnelles).</u>	113
<u>ANNEXE II : Schéma du mécanisme de fluorescence du <i>sybr green</i> (intercalant de l'ADN).</u>	114
<u>ANNEXE III : Les systèmes de PCR en temps réel.</u>	115
<u>ANNEXE IV : Méthode d'extraction par le kit High Pure PCR Template Préparation (Roche Diagnostic).</u>	116
<u>ANNEXE V : Séquence complète du gène B1 de <i>Toxoplasma gondii</i> et position des amorces TOXO F et TOXO S utilisées, à l'intérieur du gène.</u>	117
<u>ANNEXE VI : Description et fonctionnement du Rotor-Gene.</u>	118
<u>ANNEXE VII : Critères de sélection des liquides amniotiques testés : 1^{ère} application de la PCR en temps réel.</u>	119
<u>ANNEXE VIII : Protocole opératoire initial de la PCR en temps réel appliqué aux liquides amniotiques dans le cadre du diagnostic anténatal de la toxoplasmose.</u>	120
<u>ANNEXE IX : Détermination de l'efficacité de la PCR en temps réel à 63°C et pour une concentration en MgCl₂ de 3 mM.</u>	122
<u>ANNEXE X : Sensibilité de la PCR en temps réel : protocole opératoire appliqué aux solutions de toxoplasmes obtenues à partir de l'ascite de souris.</u>	125
<u>ANNEXE XI : Préparation des gels d'électrophorèse.</u>	128
<u>ANNEXE XII : Protocole opératoire complet et définitif de la PCR en temps réel appliqué aux liquides amniotiques dans le cadre du diagnostic anténatal de la toxoplasmose.</u>	129
<u>ANNEXE XIII : Critères de sélection des liquides amniotiques testés : 2^{ème} application de la PCR en temps réel.</u>	132
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	134

PARTIE I :

GENERALITES

Premier chapitre :

Toxoplasme et toxoplasmose

INTRODUCTION

La toxoplasmose est une maladie parasitaire commune à l'homme et à plusieurs espèces animales en raison de sa faible spécificité (anthropozoonose). Elle est due à un protozoaire intracellulaire obligatoire : *Toxoplasma gondii*. C'est une affection très fréquente chez l'homme, le plus souvent bénigne dans sa forme classique du sujet immunocompétent. A l'inverse, la toxoplasmose peut être particulièrement redoutable chez le sujet immunodéprimé (notamment en cas de syndrome d'immunodéficience acquise) ou lorsqu'elle atteint le fœtus lors d'une séroconversion chez la femme enceinte.

I – HISTORIQUE

L'histoire retient principalement la découverte de Nicolle et Manceau en 1908 à l'Institut Pasteur de Tunis (Nicolle et al, 1908). A la suite d'une épidémie de laboratoire chez un rongeur, *Ctenodactylus gondii*, ils isolèrent un protozoaire de forme arquée. Ils nommèrent le parasite *Toxoplasma gondii* : l'origine grecque vient de toxon (arc) et plasma (forme) (Nicolle et al, 1909). Cette découverte sera présentée le 26 octobre 1908 par Laveran, à l'Académie des Sciences de Paris. A peu près au même moment, Splendore trouve ce parasite à la suite de la mort de lapins de laboratoire, à Sao Paulo. La publication de ces résultats se fera le 16 juillet 1908.

Janku, en 1923, met en évidence des organismes kystiques sur des coupes histologiques de rétine prélevée chez un nouveau-né présentant une hydrocéphalie et une rétinite. A posteriori, leurs descriptions correspondent à des kystes toxoplasmiques.

En 1937, Wolf et ses collaborateurs ont décrit et publié le premier cas humain d'infection toxoplasmique chez un nouveau-né décédé d'une encéphalomyélite aiguë (Wolf et al, 1937). Au cours des années suivantes, de nombreux cas cliniques de toxoplasmoses acquises et congénitales sont décrits.

En 1942, Sabin fait une première description des manifestations cliniques de la toxoplasmose (Sabin, 1942) et met au point, en 1948 avec Feldman, le dye-test ou test de lyse des toxoplasmes, premier test de dépistage sérologique. Ce test a permis d'évaluer notamment l'incidence de la toxoplasmose, qui s'est révélée être une maladie très fréquente, tant chez l'homme que chez l'animal (Sabin et al, 1948). De nombreuses manifestations pathologiques purent lui être rapportées.

Afin d'explorer l'immunité humorale, Golman en 1957 met au point l'immunofluorescence microscopique (Golman, 1957) qui trouvera son application dans le diagnostic de la toxoplasmose avec la recherche des immunoglobulines M, connue sous le nom de test de Remington (1968). Entre temps, Hogman avance l'hypothèse de l'origine congénitale des toxoplasmoses oculaires, hypothèse qui sera confirmée par Feldman en 1952.

En 1970, Frenkel, Dubey, Hutchinson et Work décrivent le cycle complet de *Toxoplasma gondii* chez le chat qui est identifié comme hôte définitif (Frenkel et al, 1969 ; Hutchinson et al, 1970). Leurs travaux conduisent à l'identification de l'oocyste comme agent infectieux des selles du chat, permettant de classer *Toxoplasma gondii* parmi les coccidies. De cette découverte découlent d'importantes mesures prophylactiques. Il faudra attendre plusieurs années avant de se rendre compte que la majorité des contaminations est liée à l'ingestion de kystes toxoplasmiques.

A ce jour, hormis les félidés, aucune autre famille animale n'a été identifiée comme hôte définitif possible. Depuis, d'énormes progrès dans le diagnostic immunologique et parasitologique ont permis de préciser l'épidémiologie et l'évolution clinique selon le terrain. Les deux dernières décennies ont été marquées par le souci de maîtriser la transmission maternofoetale. La fréquence des immunodépressions a par ailleurs imposé l'amélioration du diagnostic précoce, du traitement curatif et des préventions primaires et secondaires de la réactivation toxoplasmique.

II – LE PARASITE

II.1 – Taxonomie

Toxoplasma gondii est une coccidie à multiplication intracellulaire. Elle appartient au phylum *Apicomplexa* qui regroupe les parasites avec un complexe apical (Levine, 1988). Depuis 1970, la position taxonomique du genre *Toxoplasma*, qui comporte une seule espèce, a varié au gré des diverses classifications pour ce groupe complexe de parasites.

Afin de préciser la position taxonomique du toxoplasme, le séquençage des ARN ribosomiaux est réalisé par Johnson (Johnson et al, 1987). Aujourd'hui, la position de *Toxoplasma gondii* dans la systématique est la suivante (**Tableau 1**) :

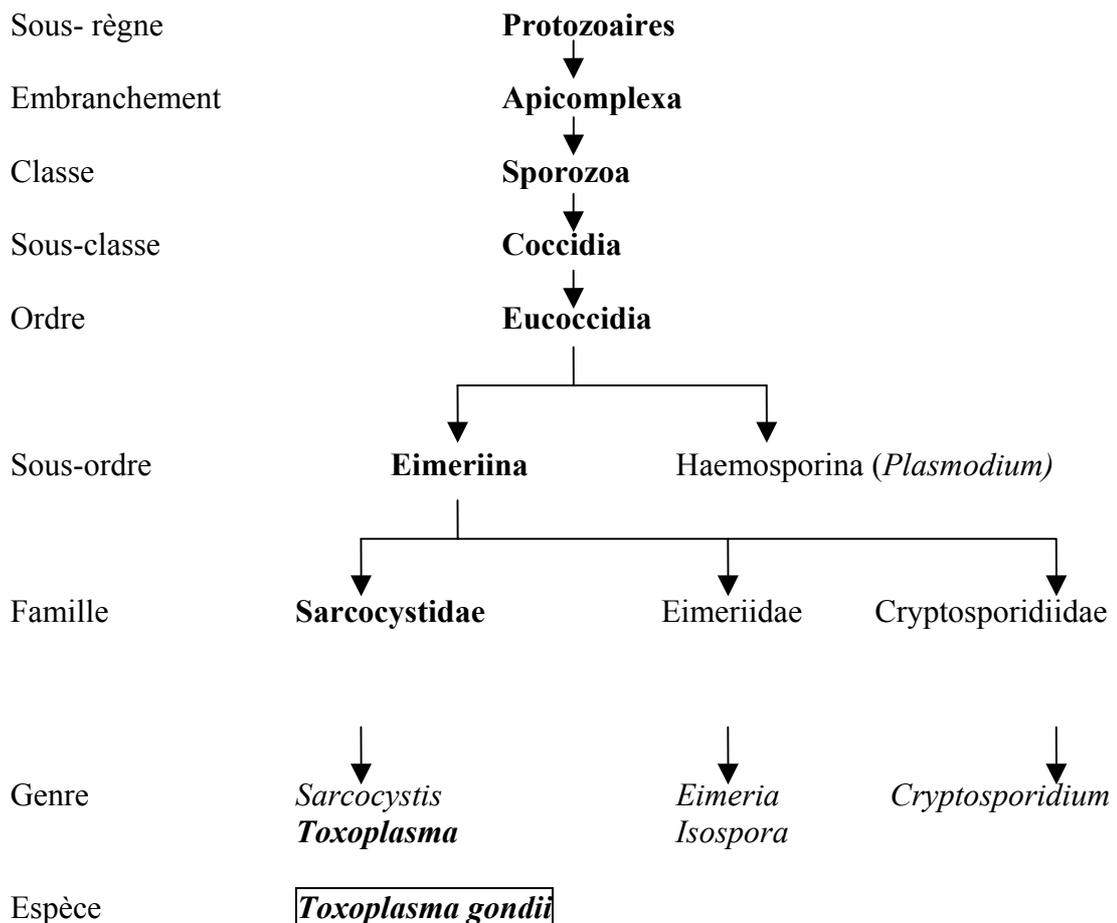


Tableau 1. Position taxonomique de *Toxoplasma gondii*.

II.2 – Morphologie

Le toxoplasme peut se présenter sous trois formes évolutives :

II.2.1 – Le tachyzoïte

Le tachyzoïte, appelé autrefois « trophozoïte », a la forme d'un croissant. Il mesure de 6 à 8 µm de long sur 3 à 4 µm de large : c'est la **forme proliférative** de *Toxoplasma gondii*. L'extrémité antérieure est effilée et l'extrémité postérieure arrondie (**Figure 1**). La paroi du parasite est formée de trois membranes (Sheffield et al, 1968) :

- le plasmalemme à l'extérieur,
- 2 membranes formant le complexe membranaire interne composé d'un ensemble de vésicules aplaties.

Le complexe apical est une structure caractéristique des *Apicomplexa*. Il est situé dans la partie antérieure du tachyzoïte et comprend un conoïde, des rhoptries, des micronèmes et des granules denses. Le conoïde, en forme de tronc de cône, est constitué de structures fibrillaires enroulées en spirale. Les rhoptries, au nombre d'une dizaine, ont une forme de massue de 1 à 4 µm de long. Les granules denses sont des organites cytoplasmiques de 200 nm de diamètre situés de part et d'autre du noyau. Leur contenu est homogène et dense aux électrons. Les micronèmes sont des organites en forme de bâtonnets, plus petits que les granules denses. Micronèmes et granules denses sont délimités par une membrane.

Le rôle du complexe apical n'est pas complètement connu mais il est très probablement associé à la pénétration du parasite à l'intérieure de la cellule hôte. En effet, le conoïde peut pivoter, s'incliner, s'étendre, se rétracter au contact de la cellule, jouant le rôle d'un organe de reconnaissance (Chiappino et al, 1984). Les rhoptries ont une fonction sécrétoire notamment d'enzymes protéolytiques comme le « Penetration Enhancing Factor » (Saffer et al, 1992). Le complexe apical permettrait de créer un environnement intracellulaire favorable au développement et à la croissance du parasite.

Le tachyzoïte pénètre dans la cellule hôte (en 15 secondes environ) de façon active ou par phagocytose (Bonhomme et al, 1992). La cellule peut contenir de 8 à 32 tachyzoïtes, elle devient globuleuse et est dénommée pseudo-kyste. Une fois dans la cellule, le parasite devient ovoïde et s'entoure d'une vacuole parasitophore dérivée du plasmalemme et de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. A l'intérieur de la vacuole, un important réseau tubulo-vésiculaire se développe à la partie postérieure du tachyzoïte (Sheffield et al, 1968), structure déjà observée par Nichols sur des cultures de toxoplasmes (Nichols et al, 1983).

Une organelle type plasmide (ADN circulaire) est également présente comme chez les autres parasites *Apicomplexa* ; elle est située dans l'apicomplaste. Son rôle est inconnu mais sa structure est très proche de celle de l'ADN des chloroplastes. Par ailleurs, l'intérieur du tachyzoïte comprend des organites classiques type mitochondries, appareil de golgi, réticulum endoplasmique.

Le tachyzoïte est **présent au stade aigu** de l'infection. Il se multiplie rapidement par endodyogénie : processus de reproduction asexuée où deux cellules filles se forment à l'intérieur de chaque parasite après division du noyau. Entre l'invasion du parasite et sa croissance, il existe une période de latence qui varie en fonction de la virulence et de la souche de toxoplasme. Parfois des divisions synchronisées de plusieurs groupes de tachyzoïtes donnent naissance à des rosettes (Bommer, 1969).

Le tachyzoïte est **très fragile** dans le milieu extérieur. Il est rapidement détruit par l'acidité gastrique et par les anticorps circulants au moment de son passage d'une cellule à l'autre. Il n'est donc pas contaminant par voie orale (Pettersen, 1979). En revanche, le tachyzoïte échappe à l'action de digestion cellulaire ce qui permet sa transformation en bradyzoïte.

II.2.2 – Kyste et bradyzoïte

Les bradyzoïtes (ou cystozoïtes) sont morphologiquement peu différents des tachyzoïtes mais sont légèrement plus petits. Leur noyau est plus postérieur et ils possèdent de nombreux granules cytoplasmiques de glycogène (Frenkel, 1973). Ce sont les formes végétatives des animaux chroniquement infestés. Leur métabolisme est réduit ainsi que leur pouvoir pathogène.

Ils forment des kystes de 5 à 100 μm , ovoïdes ou arrondis (**Figure 2**). Ces kystes peuvent contenir jusqu'à 100 bradyzoïtes et se localisent préférentiellement au niveau des muscles, du cerveau et de la rétine (Dubey, 1977). En effet, la barrière hémato-encéphalique et hémato-oculaire limitent le flux des anticorps, des cellules immunocompétentes (lymphocytes T et macrophages) et des médiateurs type lymphokines et interférons.

Le kyste est entouré d'une membrane épaisse, résistante, d'origine parasitaire et cellulaire qui limite considérablement l'impact des médicaments et des anticorps. Il peut persister tout au long de la vie sans causer de désordre cellulaire ou de réponse inflammatoire. Il produit des antigènes entretenant ainsi l'immunité. En l'absence d'immunodépression, les anticorps sont protecteurs, limitant l'infection, mais ne sont pas capables d'éradiquer le parasite.

Les kystes ne sont pas affectés par des températures inférieures à 40°C, les enzymes protéolytiques et l'acidité gastrique (Jacobs et al, 1960). Ils demeurent infectieux durant de nombreux jours dans les cadavres et pendant plusieurs mois à + 4°C. Au contraire, une congélation prolongée à - 20°C semble détruire les kystes. Ils sont également très sensibles aux micro-ondes et au rayonnement gamma.

Les kystes sont donc des **formes de résistance et de dissémination** permettant une contamination de l'homme par ingestion de viande infestée insuffisamment cuite.

<p>Le tachyzoïte mesure de 6 à 8 μm, il est fragile et présent au stade aigu de l'infection. Le bradyzoïte, légèrement plus petit, est présent à l'intérieur de kystes. Ces kystes sont des éléments de résistance et de dissémination.</p>

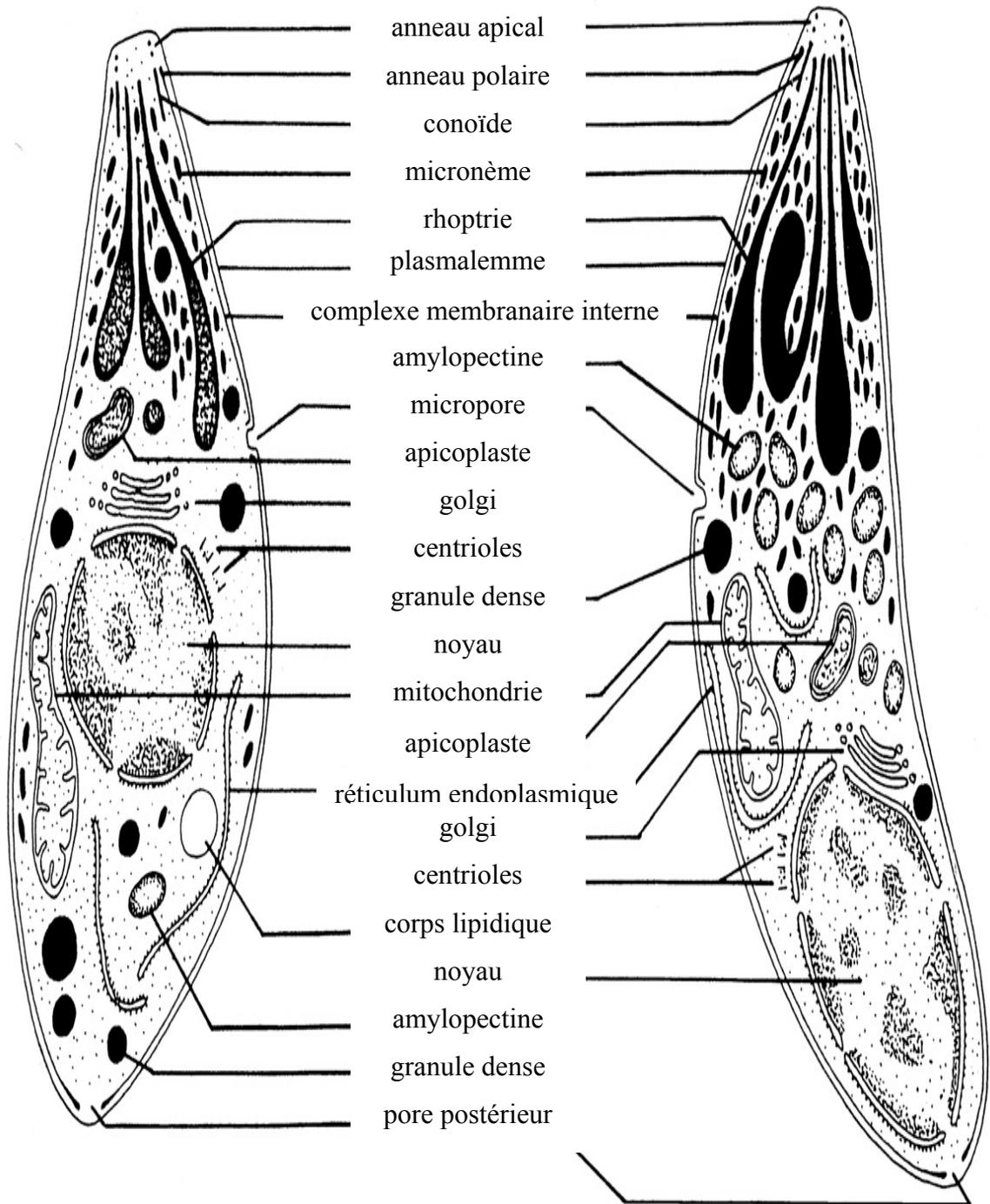


Figure 1. Schéma comparatif, à gauche, d'une forme tachyzoïte et à droite d'une forme bradyzoïte (Dubey et al, 1998).

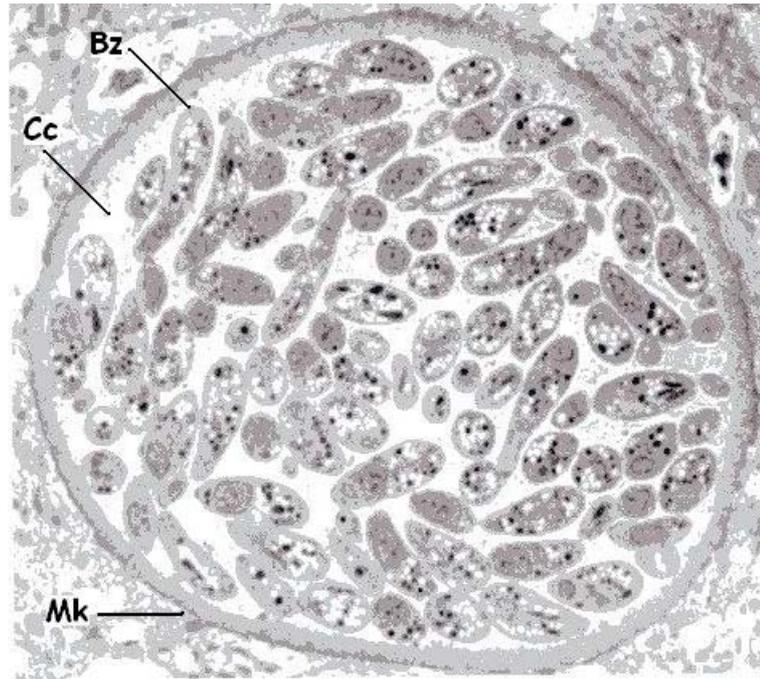


Figure 2. Kyste de *Toxoplasma gondii* contenant de nombreux bradyzoïtes. Microscopie électronique, grossissement 4000 (Ferguson et al, 1987).

Légende

- **Bz** : bradyzoïte
- **Cc** : cytoplasme cellulaire
- **Mk** : membrane kystique

II.2.3 – Oocyste

L'oocyste est issu de la reproduction sexuée dans l'intestin du chat. Ovoïde, il mesure de 9 à 11 µm de large sur 11 à 14 µm de long. Il est émis dans les fèces sous forme non sporulée.

Sa sporulation nécessite de 1 à 5 jours selon le taux d'oxygénation, la température et l'humidité environnante. A l'intérieur de l'oocyste, s'individualisent deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes haploïdes (Ferguson et al, 1978). Ceux-ci ont une structure comparable à celle du tachyzoïte.

L'oocyste est capable de demeurer infestant un an ou plus dans le sol, protégé par une membrane extérieure résistante. Il n'est pas détruit par le froid et l'acidité gastrique, mais il est sensible à la chaleur (température supérieure à 60°C) ainsi qu'à la dessiccation. Il est détruit par le formol et l'ammoniaque en solution à 0.3 %.(Nicolas et al, 1993).

II.3 – Génome et structure biochimique du parasite

Tous les stades de *Toxoplasma gondii* (sauf le macrogamète femelle fertilisé) contiennent un ADN haploïde dont la quantité est estimée entre 100 et 200 femtogramme dans un seul noyau. Le G+C est de 50 % avec un faible taux de méthylation de l'ADN (Cornelissen et al, 1984).

L'analyse de 28 souches par polymorphisme de restriction de la longueur des fragments d'ADN montre que les 10 souches virulentes ont un génotype très proche, suggérant qu'elles sont issues d'un ancêtre commun (Sibleyl et al, 1992). **Le tableau 2** regroupe les principaux gènes étudiés et protéines correspondantes.

Protéines et glycoprotéines produites	Nombre de copies du gène	Séquence totale du gène	Localisation de la protéine	Références
P 54 β tubuline	1	non	microtubule	Schwartzman et al, 1985
P 54 α tubuline	1	non	microtubule	Boothroyd et al, 1987
ADNr	répété 100 fois	non	petite sous unité du ribosome	Johnson et al, 1987
P 30	1	oui	surface, vacuole parasitophore	Burg et al 1988
Gène B1	35	oui	inconnue	Burg et al, 1989
Gp 28	1	oui	granule dense, cytoplasme, golgi	Prince et al, 1989
P 63, NTPase	1-5	non	membrane, mitochondrie	Johnson et al, 1989
P 23	1	oui	granule dense	Cesbron et al, 1989
Gp 22	1	oui	surface	Prince et al, 1990
Gène H4 Gène H1	1 1	non non	inconnue inconnue	Johnson et al, 1991
Séquence TGR1E	répété en nombre variable	inconnue	inconnue	Christina et al, 1991

Tableau 2. Principaux gènes et protéines étudiés de *Toxoplasma gondii*.

La structure biochimique de *Toxoplasma gondii* est complexe. C'est le stade tachyzoïte qui est le mieux connu et plusieurs molécules ont été identifiées à sa surface. **La protéine P30**, la plus abondante (constituant 5% des protéines totales), joue un rôle important dans la réponse immunitaire (protéine immunogène entraînant une réponse anticorps rapide). Certaines protéines sont spécifiques du stade sporozoïte (P25 et P67), du stade bradyzoïte (P18, P21, P34 et P36) et du stade tachyzoïte (P22, P30 et P35) (Couvreur et al, 1988a ; Fortier et al, 1996).

II.4 – Cycle évolutif du parasite et modes de contamination de l'homme

II.4.1 – Cycle évolutif (Figure 3)

Le cycle biologique de *Toxoplasma gondii* comprend deux étapes :

- une phase de reproduction dans l'intestin du chat qui est l'hôte définitif,
- une phase proliférative chez les hôtes intermédiaires (oiseaux, mammifères y compris l'homme).

II.4.1.1 – Evolution chez l'hôte définitif : le chat (cycle entéro-épithélial)

Le chat s'infeste en dévorant des rongeurs ou des oiseaux parasités par des kystes ou à partir d'oocystes mûrs souillant la terre ou les herbes. Le premier mode de contamination correspond à un cycle hétéroxène (plusieurs hôtes successifs) et le deuxième à un cycle monoxène (parasite évoluant chez un seul hôte).

Dans l'intestin de l'animal, les kystes ou les oocystes mûrs lysés libèrent les formes végétatives qui vont se multiplier par reproduction asexuée (ou schizogonie, Ferguson et al, 1974). Après plusieurs cycles schizogoniques, quelques schizozoïtes ou mérozoïtes vont se différencier en microgamètes mâles et en macrogamètes femelles (gamétocytes ou éléments sexués). L'oocyste qui est issu de la fécondation (ou gamogonie) tombe dans la lumière intestinale (Ferguson et al, 1975). Il sera éliminé dans le milieu extérieur en même temps que les selles, 3 à 10 jours après l'ingestion de kystes, plus de 18 jours après l'ingestion d'oocystes (Dubey, 1996).

L'élimination importante d'oocystes (environ 1 million par jour) est transitoire et ne dure que quelques jours. L'oocyste n'atteint sa maturité que dans le milieu extérieur après sporulation (Ferguson et al, 1978).

II.4.1.2 – Evolution chez les hôtes intermédiaires

Les hôtes intermédiaires sont nombreux : ils comprennent l'homme et tous les homéothermes carnivores et omnivores. L'infestation est essentiellement déterminée par l'ingestion de kystes (chez l'homme) ou d'oocystes matures (herbivores). Elle aboutit à la libération digestive de bradyzoïtes ou de sporozoïtes qui transitent par le système lymphatique. Ils sont ensuite rapidement transformés en tachyzoïtes. Leur multiplication dans le système réticulo-histiocytaire permet une diffusion parasitaire dans l'ensemble de l'organisme via la circulation sanguine (phase aiguë). La formation de kystes intra-tissulaires est rapide, parfois en moins de 10 jours (phase latente chronique).

En cas d'immunodépression, la membrane kystique se rompt et les bradyzoïtes peuvent redonner des tachyzoïtes. Les mécanismes exacts demeurent encore inexploqués (Ferguson et al, 1989).

***Toxoplasma gondii* présente une spécificité étroite pour son hôte définitif : le chat, qui constitue un réservoir important et de ce fait contribue à la propagation du parasite. Au contraire, il ne présente pratiquement pas de spécificité vis-à-vis de son hôte intermédiaire.**

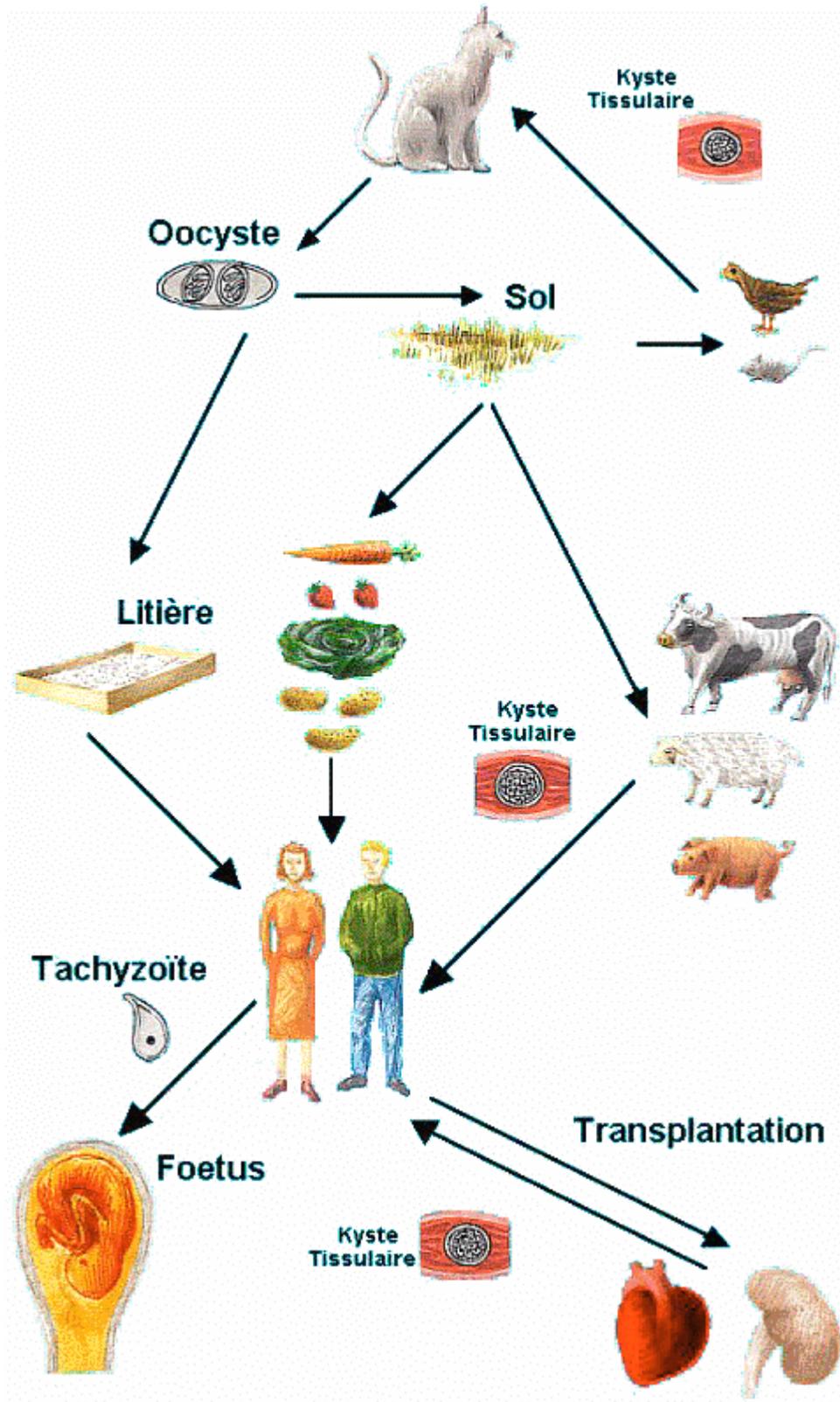


Figure 3. Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* (Fortier et al, 2000).

II.4.2 – Modes de contamination de l'homme

Plusieurs modes de contamination sont possibles :

II.4.2.1 – A partir de kystes

L'homme se contamine par ingestion de viandes parasitées insuffisamment cuites ou crues et non conservées par la congélation (mouton, agneau, bœuf, porc). Ce **mode de contamination est de loin le plus fréquent** dans les pays à haut niveau de vie. Les kystes présents dans les greffons peuvent contaminer le receveur et être à l'origine de toxoplasmoses graves, favorisées par le traitement immunosuppresseur.

II.4.2.2 – A partir d'oocystes

La contamination se fait par l'intermédiaire des aliments ou des boissons souillés par les oocystes (fruits, crudités), ou par contact avec la terre, les litières souillées. Ce mode de contamination est moins fréquent et plus volontiers retrouvé dans les populations à hygiène de vie précaire.

II.4.2.3 – A partir des tachyzoïtes

C'est le **mode de contamination du fœtus**. Après contamination de la mère, il s'ensuit une diffusion hématogène du parasite qui peut contaminer le fœtus via le placenta lésé, abcédé.

Les tachyzoïtes peuvent être contaminants au cours d'une transfusion sanguine ou d'un accident de manipulation au laboratoire. Ces contaminations accidentelles sont exceptionnelles.

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

III – ASPECTS CLINIQUES DE LA TOXOPLASMOSE

III.1 – La toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

III.1.1 – La forme asymptomatique

C'est le **cas le plus fréquent** et une sérologie positive, témoignant d'une infection ancienne, est mise en évidence à l'occasion d'examens biologiques systématiques, prénuptiaux, ou lors d'une grossesse.

III.1.2 – La toxoplasmose aiguë bénigne

Ce tableau clinique ne concerne que 15 à 20 % des toxoplasmoses acquises. Parmi les formes apparentes, la plus fréquente est la forme ganglionnaire qui comprend une triade symptomatique :

- **la fièvre** est modérée (38-38.5°C) et inconstante (moins de 50 % des cas). Il s'agit d'un fébricule quotidien qui persiste pendant quelques semaines et disparaît spontanément.

- **les adénopathies** constituent le symptôme le plus constant (90 % des cas). Elles sont non inflammatoires, légèrement douloureuses et presque toujours cervicales. Parfois, d'autres territoires sont atteints : aires axillaires, inguinales, ou même les ganglions profonds. Dans certains cas, les ganglions persistent de 6 mois à 1 an.

- **l'asthénie**, souvent profonde quand elle existe, va persister longtemps après la disparition des ganglions. Le mécanisme et la pathogénie de l'asthénie sont encore mal élucidés.

L'évolution est en règle générale bénigne et la guérison sans complication se fait normalement, de façon spontanée, sans traitement.

III.2 – La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale est responsable de tableaux cliniques variés et de gravités différentes, allant de l'absence de symptôme à la mort *in utero*. Ce polymorphisme est étroitement lié à la date de contamination maternelle.

III.2.1 – Contamination du 1^{er} trimestre de grossesse

Elle correspond à la forme majeure aujourd'hui devenue très rare. Elle conduit :

- soit à la mort du fœtus avec avortement spontané,
- soit à la naissance d'un enfant avec un tableau d'encéphalo-méningo-myélite-toxoplasmique. Ce tableau est caractérisé par quatre groupes de signes :

1) **aspect et volume du crâne** : macrocéphalie avec hydrocéphalie, bombement des fontanelles et des sutures, augmentation du périmètre crânien qui, dès la naissance, est supérieur à la normale mais surtout augmente plus vite que la normale.

2) **signes neurologiques** avec :

- ◆ des convulsions généralisées,
- ◆ des troubles du tonus avec soit une hypertonie associée à des contractures, soit au contraire une hypotonie pouvant donner un aspect clinique dit en « poupée de chiffon »,
- ◆ une modification des réflexes, exagérés ou abolis,
- ◆ des troubles végétatifs (irrégularité respiratoire, déséquilibre thermique, trouble de la déglutition).

3) **calcifications intracrâniennes** : elles sont pathognomoniques, parfois nodulaires, isolées ou groupées en amas, parfois curvilignes.

4) **lésions oculaires** avec :

- ◆ une chorioretinite pigmentaire maculaire découverte à l'examen du fond de l'œil qui est très caractéristique et évolutive,
- ◆ une microphthalmie, un strabisme, un nystagmus.

Suite aux séquelles gravissimes, l'évolution se fait habituellement vers la mort dans les premières semaines ou dans les premiers mois de vie. Sinon, l'affection évolue vers la chronicité avec des enfants présentant des retards psychomoteurs considérables.

III.2.2 – Contamination du 2^{ème} et du 3^{ème} trimestre de grossesse

Elles peuvent correspondre à deux formes cliniques.

III.2.2.1 – Les formes viscérales

Elles sont caractérisées soit :

- par un ictère néonatal avec une hépatosplénomégalie et des hémorragies muqueuses,
- par une atteinte digestive aiguë à type d'œsophagite ou de colites ulcéro-hémorragiques.

Leurs évolutions sont habituellement mortelles.

III.2.2.2 – Les formes dégradées ou retardées

Les symptômes sont présents dès la naissance ou quelquefois après plusieurs années. Il peut s'agir d'un retard psychomoteur, d'un périmètre crânien augmentant plus rapidement que la normale, de crises convulsives ou d'une chorioretinite pigmentaire.

II.2.3 – Les formes inapparentes ou infra-cliniques

A la naissance, 10 à 15 % des enfants contaminés *in utero* par le toxoplasme présentent des symptômes plus ou moins graves. En revanche, **plus de 80 % des enfants sont asymptomatiques**, notamment lorsque la contamination est proche du terme de la grossesse (Desmonts et al, 1982a). Ces formes infra-cliniques ont uniquement une traduction sérologique avec mise en évidence d'anticorps antitoxoplasmiques. Ce dépistage est capital car le nouveau-né risque de souffrir de troubles à distance : la toxoplasmose est une sorte de « bombe à retardement ». Plus de 40 % des enfants non traités présenteront des atteintes oculaires à type de chorioretinite avec diminution permanente de l'acuité visuelle (Couvreur et al, 1993a).

III.3 – La toxoplasmose de l'immunodéprimé

III.3.1 – La toxoplasmose et le VIH

L'encéphalite est la principale localisation de la toxoplasmose au cours du SIDA. Elle associe fièvre, céphalées et des signes neurologiques.

Ces signes neurologiques peuvent correspondre à :

- des troubles de la conscience,
- des convulsions,
- une hémiplégie,
- des troubles du langage,
- divers signes polymorphes en fonction de la localisation des abcès cérébraux.

D'autres localisations sont possibles, comme les atteintes pulmonaires se traduisant par une pneumopathie (comparable à une pneumocystose) qui peut évoluer vers l'insuffisance respiratoire.

A la faveur de l'immunodépression, les bradyzoïtes contenus dans les kystes reprennent une multiplication active sur place et peuvent disséminer par voie hématogène (réactivation). En l'absence antécédent de toxoplasmose, la symptomatologie sera d'emblée grave en cas de contamination par le parasite. Chez les patients atteints du SIDA, la quasi-totalité des toxoplasmoses survient quand les lymphocytes CD4 sont inférieurs à 100 / mm³. Depuis l'avènement de la trithérapie, la fréquence et la gravité des toxoplasmoses cérébrales sont moindres, ce qui a permis d'arrêter la prophylaxie primaire par le cotrimoxazole.

III.3.2 – Toxoplasmose et transplantation

Suite à un traitement immunosuppresseur, la toxoplasmose ressemble cliniquement à celle du patient VIH. Il s'agit également d'une réactivation de toxoplasmes quiescents due à l'immunodépression cellulaire acquise. C'est surtout dans les greffes de moelle osseuse que le risque est accru du fait de l'intensité et de la durée de l'immunodépression. Après multiplication très active, les tachyzoïtes induisent une toxoplasmose disséminée avec le plus souvent des lésions du système nerveux central. La toxoplasmose consécutive à la transplantation d'un organe infecté, à un receveur non immun, est très similaire à la toxoplasmose congénitale. C'est pour les greffes cardiaques que le risque est le plus important (supérieur à 50 %), justifiant la prophylaxie par une association pyriméthamine-sulfamides.

Deuxième chapitre :

La toxoplasmose congénitale

I – DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

I.1 – Répartition géographique de la toxoplasmose

La toxoplasmose est une parasitose **cosmopolite**. La prévalence de la toxoplasmose au niveau mondial est très contrastée. En Europe, on distingue trois zones en ce qui concerne la séroprévalence chez les femmes en âge de procréer (Zuber et al, 1995) :

- une zone scandinave anglo-saxonne à faible prévalence (< à 30%),
- une zone méditerranéenne à prévalence modérée (20 à 50%),
- une zone franco-allemande à forte prévalence (50 à 75%).

Parmi de nombreux facteurs pouvant influencer l'incidence de la toxoplasmose, il faut citer (Dupouy-Camet et al, 1993a) :

- l'importance de la population féline,
- les conditions climatiques (les climats secs, très chauds ou très froids, ne favorisent pas le développement du parasite),
- les méthodes d'élevage des animaux domestiques,
- les habitudes culturelles dans la préparation des viandes,
- les conditions d'hygiène.

I.2 – Séroprévalence chez la femme enceinte

En France, il existe des disparités régionales (**Figure 4**). Quatre zones sont ainsi individualisées en fonction de la séroprévalence :

- l'Est et le Centre-Est (prévalence basse < 45 %),
- le Centre-Ouest (prévalence faible ou moyenne de 45 à 55 %),
- le quart Nord-Ouest (prévalence supérieure à la moyenne de 45 à 65 %),
- le Sud-Ouest (prévalence élevée > à 65 %).

Les enquêtes épidémiologiques, entre 1965 et 1995, montrent une diminution constante de la séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes. Elle est estimée à **54.3 %** (Ancelle et al, 1996) contre 80 % dans les années 60. Cette diminution s'explique par une prise de conscience collective à l'égard de l'importance et du respect des **mesures hygiéno-diététiques**, ainsi que par la généralisation de la **congélation** des aliments.

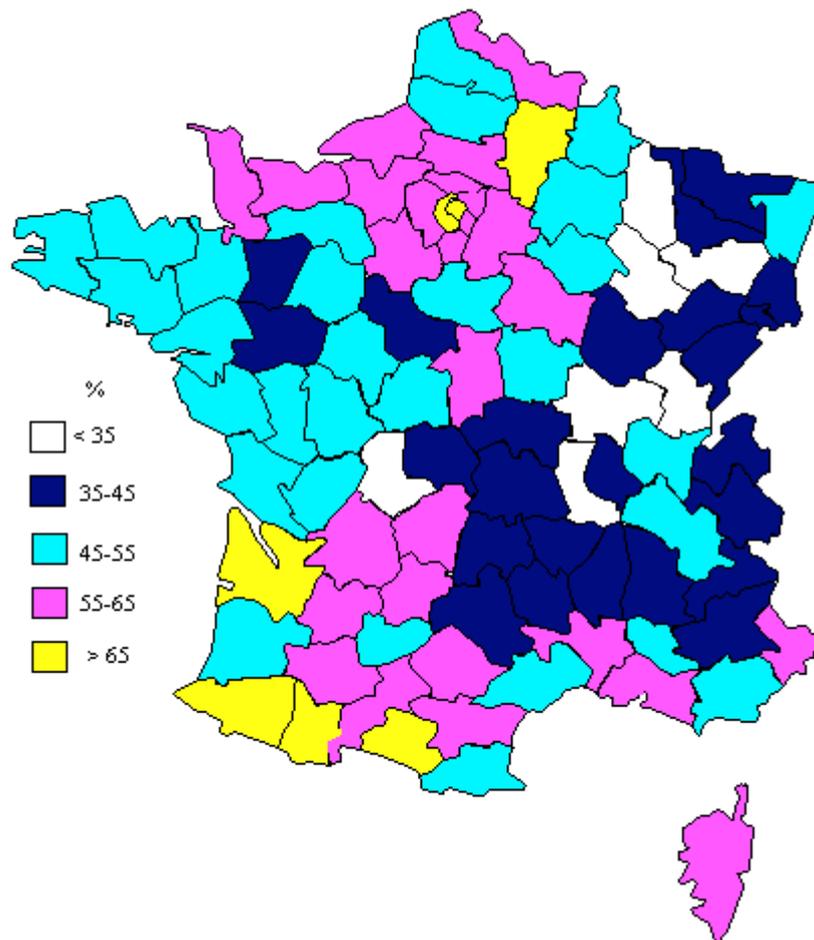


Figure 4. Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes selon le département d'habitation (Ancelle et al, 1996).

I.3 – Taux de séroconversion au cours de la grossesse

Le taux global de séroconversion est de l'ordre de 4 à 5 pour 1000 grossesses pour une durée d'exposition de 9 mois (Carme et al, 1996). Les facteurs de risque d'infection pendant la grossesse ont fait l'objet de plusieurs études « cas témoins » (Goulet et al, 1990 ; Dupouy-Camet et al, 1993a ; Carme et al, 1994 ; Wallon et al, 1994). Toutes s'accordent sur le fait que les facteurs de risque les plus significativement associés à la survenue d'une toxoplasmose pendant la grossesse sont la **consommation de viande saignante**, l'ingestion de fruits et de légumes non lavés, la présence d'un chat au foyer. Il semblerait cependant que le rôle direct du chat soit moins déterminant que les autres facteurs.

I.4 – Prévalence de la toxoplasmose congénitale

La fréquence des toxoplasmoses congénitales est de 1 à 3 cas pour 1000 naissances. Elles concerneraient 700 à 3000 enfants par année et le nombre de cas de toxoplasmose congénitale grave est estimé à 150 par an en France (Dupouy-Camet et al, 1993a).

Près d'une femme sur deux en âge de procréer n'a jamais été en contact avec le parasite.

II – PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATTEINTE FŒTALE

II.1 – La transmission materno-fœtale : rôle du placenta

La toxoplasmose congénitale est la conséquence d'une primo-infection toxoplasmique chez une femme en cours de grossesse. Après contamination de la mère, le parasite passe dans la circulation sanguine. Cette **parasitémie** maternelle est **précoce, transitoire** (de l'ordre de 10 à 15 jours) et antérieure à l'apparition des anticorps (Garin et al, 1984). Ce caractère précoce et transitoire explique la rareté des toxoplasmoses congénitales consécutives à une infection de la mère contractée avant la grossesse. Cependant, quelques cas échappent à cette règle notamment chez les femmes immunodéprimées en cas de SIDA, de maladie de Hodgkin et de corticothérapie dans les maladies auto-immunes sévères (Desmonts et al, 1990 ; Marty et al, 1991), mais également chez des femmes sans anomalie immunitaire particulière (Fortier et al, 1991 ; Hennequin et al, 1997). Il est logique d'admettre que de tels cas sont la conséquence d'une parasitémie récurrente. A la suite de ce constat, Couvreur préconise deux recommandations (Couvreur, 1999) :

- de respecter un délai de 6 mois avant toute grossesse chez les femmes ayant fait une toxoplasmose acquise récente,

- d'assurer une surveillance échographique et biologique accrue chez les femmes ayant fait une séroconversion périconceptionnelle récente.

La contamination materno-fœtale est déterminée par le passage transplacentaire du parasite. L'invasion et la multiplication du parasite dans le placenta sont des étapes incontournables : la placentopathie précède toujours la fœtopathie. Le placenta reste avant tout une barrière au franchissement des toxoplasmes et entraîne un délai variable au passage, non obligatoire, du parasite de la mère au fœtus. Ce **délai placentaire** ou « période d'incubation périnatale » est étroitement lié à la vascularisation du placenta, très développée en fin de grossesse. Le délai placentaire est d'autant plus long que la

contamination a eu lieu tôt dans la grossesse et d'autant plus court que la contamination a eu lieu tard.

De ce fait, dans le cas **d'une infection maternelle proche de la conception** la **transmission** du parasite au fœtus est faible : **moins de 2 %** (Desmonts et al, 1982a). A ce stade, si le délai placentaire est court (contamination fœtale contemporaine de la contamination maternelle) l'atteinte du fœtus est gravissime pour deux raisons :

- le fœtus est immunitairement immature. Il n'est capable de synthétiser des anticorps qu'à partir de la 10^{ème} semaine d'aménorrhée (Desmonts et al, 1982b)

- les IgG spécifiques d'origine maternelle, seul isotype capable de franchir la barrière placentaire, n'ont pas eu le temps d'être transmises au fœtus.

Lorsque **l'infection maternelle est proche du terme** de la grossesse, la **transmission** du toxoplasme au fœtus est **de l'ordre de 90 %** (Desmonts et al, 1982a). A ce stade, la contamination fœtale est en générale contemporaine de la contamination maternelle mais l'atteinte fœtale est moindre et le plus souvent infra-clinique. En effet, le système immunitaire du fœtus 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. Ils n'agissent pas sur les formes intracellulaires. De plus, ils induisent une tolérance immunitaire fœtale en retardant la reconnaissance des antigènes parasitaires par les cellules immunocompétentes du fœtus. L'infection est ralentie, atténuée mais elle sera prolongée et laissera l'enfant porteur d'un grand nombre de kystes (Desmonts et al, 1984). Le **tableau 3** résume la physiopathologie de la toxoplasmose congénitale.

<p>La durée du délai placentaire est un facteur primordial dans la genèse de la toxoplasmose congénitale. La toxoplasmose maternelle n'est pas synonyme de toxoplasmose congénitale. L'infection du fœtus survient, en moyenne, dans 25 % des cas, tous trimestres confondus et sous traitement.</p>

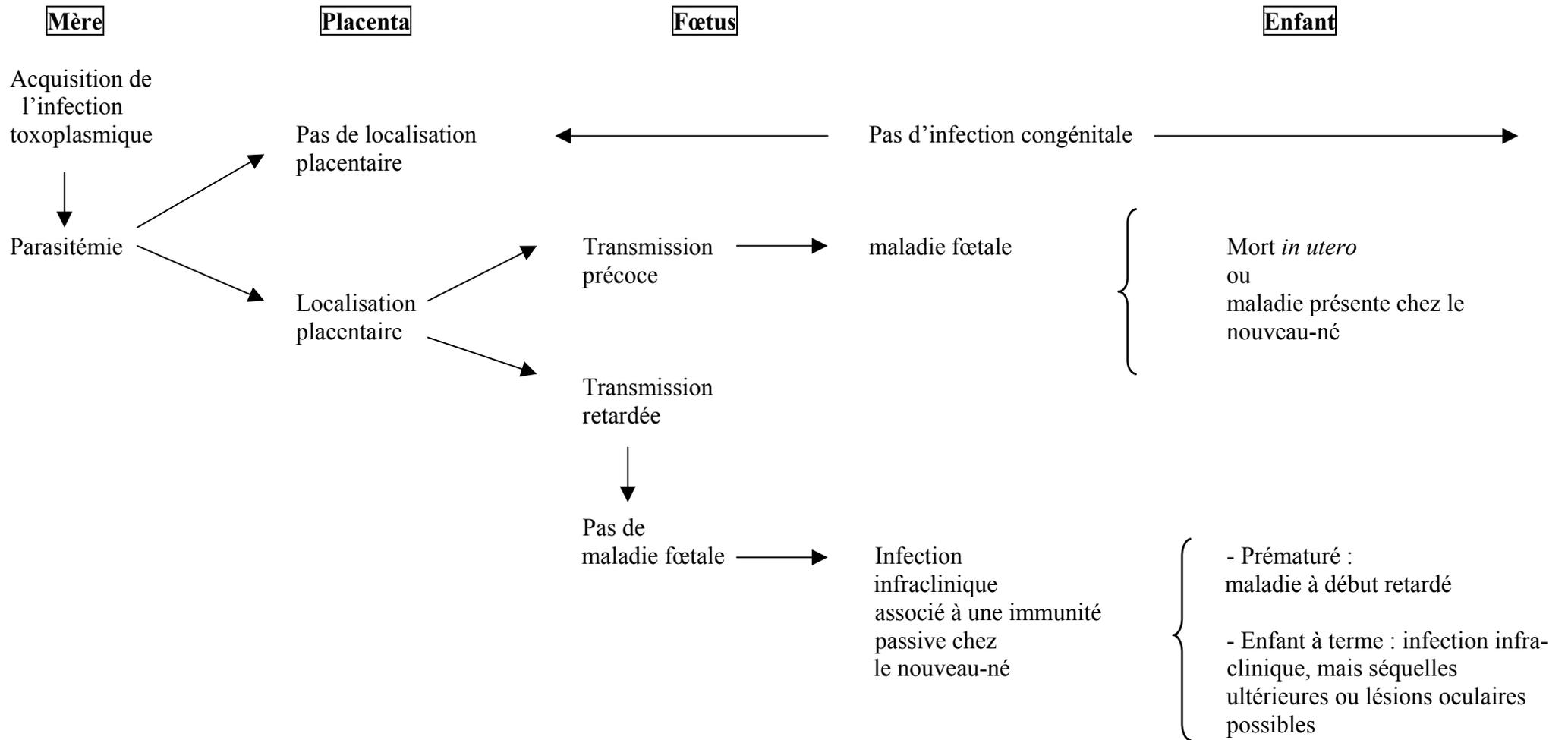


Tableau 3. Schéma de l'histoire naturelle de l'infection toxoplasmique congénitale (Desmonts et al, 1984).

II.2 – Risque d'infection fœtale

La fréquence et la gravité de l'atteinte fœtale dépendent de différents facteurs :

1) la date de contamination maternelle (Tableau 4) :

Epoque de l'infection maternelle	Risque fœtal	
	de transmission	de gravité si transmission
Antérieure à la conception	nul (sauf si déficit immunitaire)	
Péri-conceptionnelle	faible (environ 1 %)	risque maximal
Avant 16 semaines d'aménorrhée	important - mère traitée : 5 % - mère non traitée : 15%	risque maximal
Après 16 semaines d'aménorrhée	maximal - 20 % entre 16 et 26 semaines - plus de 90 % à terme	d'autant moindre que l'infection est plus proche du terme (mais enfant à traiter)

Tableau 4. Pronostic fœtal toxoplasmique en fonction de la date de contamination maternelle (Thuilliez, 1993).

2) **le délai et le stade de développement placentaire** : la structure, la vascularisation et l'efficacité de la barrière placentaire dépendent de l'âge de la grossesse ce qui explique la fréquence progressive de la transmission.

3) **l'état immunitaire du fœtus** et son aptitude à synthétiser des anticorps dès le deuxième trimestre.

4) le passage transplacentaire **d'anticorps maternels** : la quantité d'IgG naturelles transmises joue un rôle dans la réponse immunitaire du fœtus (phénomène de tolérance). Les IgG limitent, de surcroît, la dissémination des toxoplasmes.

5) l'importance de la **parasitémie** maternelle et la capacité de réponse immunitaire humorale et cellulaire de la mère.

6) la **virulence** de la souche de toxoplasme : le risque de transmission et d'infection fœtale pourrait varier suivant les souches, bien qu'aucun lien entre un type de souche (virulente ou avirulente pour la souris) et la transmission au fœtus n'ait été prouvé (Zenner et al, 1993).

7) le type et la **précocité du traitement** mis en œuvre.

La période de contamination maternelle la plus critique se situe entre la 10^{ème} et 24^{ème} semaine d'aménorrhée où la fréquence de transmission materno-fœtale et la gravité des lésions fœtales se conjuguent.

III – PREVENTION PRIMAIRE DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE

Elle repose sur la prévention de toute infection évolutive maternelle par :

1) un dépistage sérologique au cours de l'examen prénuptial ou prénatal afin de déterminer le statut immunitaire des femmes vis-à-vis de la toxoplasmose,

2) chez les femmes non immunisées par :

- une surveillance mensuelle pendant la grossesse,
- la connaissance et la diffusion de l'information relative aux mesures hygiéno-diététiques.

III.1 – Le dépistage et la surveillance sérologique

En France, les textes législatifs prévoient un dépistage sérologique systématique de la toxoplasmose 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 toutes les femmes de statut sérologique inconnu ou chez toute femme ayant présenté un résultat sérologique négatif lors de l'examen prénuptial (arrêté du 18 avril 1985).

Une immunité confirmée élimine tout risque de contamination fœtale et donc toute surveillance ultérieure.

La législation française (décret du 14 février 1992) impose également un suivi sérologique mensuel jusqu'à l'accouchement chez la femme enceinte non immunisée, dans le but de diagnostiquer tout début d'infection et de traiter précocement. Le biologiste est légalement tenu de quantifier les IgG en UI/ml et de détecter les IgM avec indication dans le compte rendu des méthodes utilisées. Il est tenu de conserver le sérum (-30°C) pendant un an, dès lors que l'examen a été réalisé pendant la grossesse. L'arrêté du 25 avril 1995 précise les conditions de travail du biologiste, l'obligeant à apporter une conclusion au médecin prescripteur sur la présence ou l'absence d'anticorps antitoxoplasmiques et sur l'ancienneté de l'infection en cas de positivité. Cet arrêté oblige également à proposer les modalités du suivi sérologique éventuel et à utiliser une 3^{ème} technique sérologique si nécessaire.

Les anticorps antitoxoplasmiques sont surtout des marqueurs de l'infection et constituent la base du dépistage et de la surveillance de la toxoplasmose chez la femme enceinte.

III.1.1 – Les techniques sérologiques

Le toxoplasme est une mosaïque d'antigènes, ubiquitaires reconnus par des anticorps présents dans l'organisme en dehors de toute infection toxoplasmique (IgM naturelles) et d'antigènes propres (membranaires, cytoplasmiques, excrétés, sécrétés) induisant la synthèse d'anticorps spécifiques au cours de l'infection.

III.1.1.1 – Les techniques utilisant les antigènes figurés (Tableau 5)

Ils correspondent à des toxoplasmes intacts, soit vivants soit fixés. Les parasites sont obtenus à partir d'ascites de souris après inoculation de la souche RH ou à partir de cultures cellulaires sur fibroblastes. Ces techniques détectent des anticorps dirigés contre les antigènes membranaires, en particulier contre la protéine P30, composant majeur de la membrane.

Techniques	Immuno-globulines	Principe	Avantages et inconvénients
Dye-test	IgG	lyse des trophozoïtes vivants par des anticorps spécifiques en présence du complément	méthode de référence, très sensible (seuil = 2 UI/L), très spécifique, positivation précoce 8 à 15 jours après la primo-infection, mais délicate à mettre en œuvre donc réservée aux laboratoires spécialisés
Immunofluorescence indirecte (IFI)	IgG, IgM	trophozoïtes fixés sur une lame de verre en présence de dilutions du sérum, révélation par une anti-globuline marquée par un fluorophore	moins sensible (faux négatifs), moins spécifique (interférence du facteur rhumatoïde, des anticorps antinucléaires), lecture délicate
Agglutination directe	IgG	suspension de trophozoïtes en présence du sérum, agglutination par les anticorps	très sensible et très spécifique, lecture facile, méthode simple mais non automatisable
Agglutination différentielle	IgG précoce	agglutination de deux suspensions de toxoplasmes traités différemment par des anticorps	détection précoce des IgG, datation de la séroconversion, laboratoires spécialisés
ISAGA	IgM, IgA	immunocapture des IgM ou IgA par des immunoglobulines anti-chaîne μ ou α adsorbées sur des cupules, détection de l'agglutination par des toxoplasmes formolés et trypsinés	se positive très rapidement, mais reste positif pendant plusieurs mois, très sensible, très spécifique : pas d'interférence du facteur rhumatoïde, résultats semi-quantitatifs, lecture parfois délicate

Tableau 5. Les techniques utilisant les antigènes figurés.

Les techniques utilisant les antigènes membranaires permettent la mise en évidence d'anticorps produits précocement au cours de l'infection toxoplasmique.

III.1.1.2 – Les techniques utilisant les antigènes solubles

(Tableau 6)

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

Techniques	Immuno-globulines	Principe	Avantages et inconvénients
Agglutination passive	IgG, IgM	des hématies de moutons stabilisées et sensibilisées avec des antigènes toxoplasmiques sont mises en contact avec des échantillons sériques dilués	sensibilité variable en fonction de l'antigène, peu spécifique (anticorps naturels), peu reproductible
Latex	Ig totales	les antigènes sont fixés sur des hématies agglutinées en présence d'anticorps	sensibilité variable en fonction de l'antigène, faux négatifs par phénomène de zone, technique de dépistage
ELISA	IgG, IgM, IgA	la révélation des anticorps du sérum se fait par une anti-globuline humaine marquée par un enzyme, méthode sandwich ou immunocapture	technique sensible, spécifique, reproductible et automatisable, sensibilité variable en début d'infection, absence de standardisation des réactifs
ELISA / avidité	IgG	sérum traité par un agent dissociant (l'urée)	détection précoce des IgG, intérêt pour la datation de la séroconversion

Tableau 6. Les techniques utilisant les antigènes solubles.

Les techniques utilisant les antigènes solubles détectent des immunoglobulines G de spécificité différente, elles apparaissent plus tardivement que les anticorps détectés avec les techniques utilisant les antigènes figurés.

III.1.2 – Cinétique des anticorps au cours d'une séroconversion

La réponse humorale et la cinétique des anticorps varient en fonction des isotypes étudiés mais également de la technique utilisée pour chaque isotype (**Figure 5**).

III.1.2.1 – Les IgM

Comme dans la plupart des infections, les IgM sont les **premières à apparaître** dans les jours suivant la contamination. Elles sont au maximum dans les premières semaines puis régressent classiquement en moins de 4 mois. Cependant, la cinétique de ces anticorps ne s'interprète plus comme naguère et la présence d'IgM témoin d'une infection récente n'est plus de mise. En effet, avec les nouvelles techniques d'immunocapture comme l'ISAGA (Immuno-Sorbent Agglutination Assay), les IgM persistent 6 à 12 mois, voire plus, après la séroconversion (Duffy et al, 1989). Au contraire, avec l'immunofluorescence indirecte, les IgM persistent rarement au-delà de 3 mois. Ces techniques d'immunocapture sont **extrêmement sensibles** et ont été mises au point pour s'affranchir des faux positifs (facteur rhumatoïde, anticorps antinucléaires, anticorps naturels) et des faux négatifs (compétition entre les IgG et les IgM pour les mêmes sites antigéniques). Dans l'ISAGA, les résultats ne donnent qu'une évaluation semi-quantitative des IgM sériques, l'indice étant compris entre 0 et 12, le seuil de spécificité étant déterminé à 9.

III.1.2.2 – Les IgG

Les IgG ont une cinétique décalée par rapport aux IgM : **elles apparaissent plus tardivement**. De même, en fonction des techniques utilisées, leur cinétique est différente. Ainsi, les IgG de spécificité membranaire apparaissent dans les 2 ou 3 semaines qui suivent l'infection, atteignent un taux maximum à 2 mois et après plusieurs mois diminuent progressivement jusqu'à des taux résiduels variables, témoins d'une immunité ancienne (Derouin et al, 1993). Les anticorps détectés par les techniques utilisant un antigène soluble, extrait après lyse du parasite, apparaissent avec un retard de 2 à 4 semaines et atteignent un maximum 3 à 6 mois après la contamination. Ceci s'explique par la réponse humorale d'abord dirigée contre les antigènes membranaires puis cytoplasmiques au cours de la primo-infection.

Actuellement, seul le Dye-test et l'immunofluorescence indirecte (test de Remington) bénéficient d'un sérum de référence et autorisent l'utilisation d'unités internationales (UI). La standardisation des unités de toutes les techniques à l'aide de ce sérum de référence se heurte à la difficulté de conversion des titres en UI.

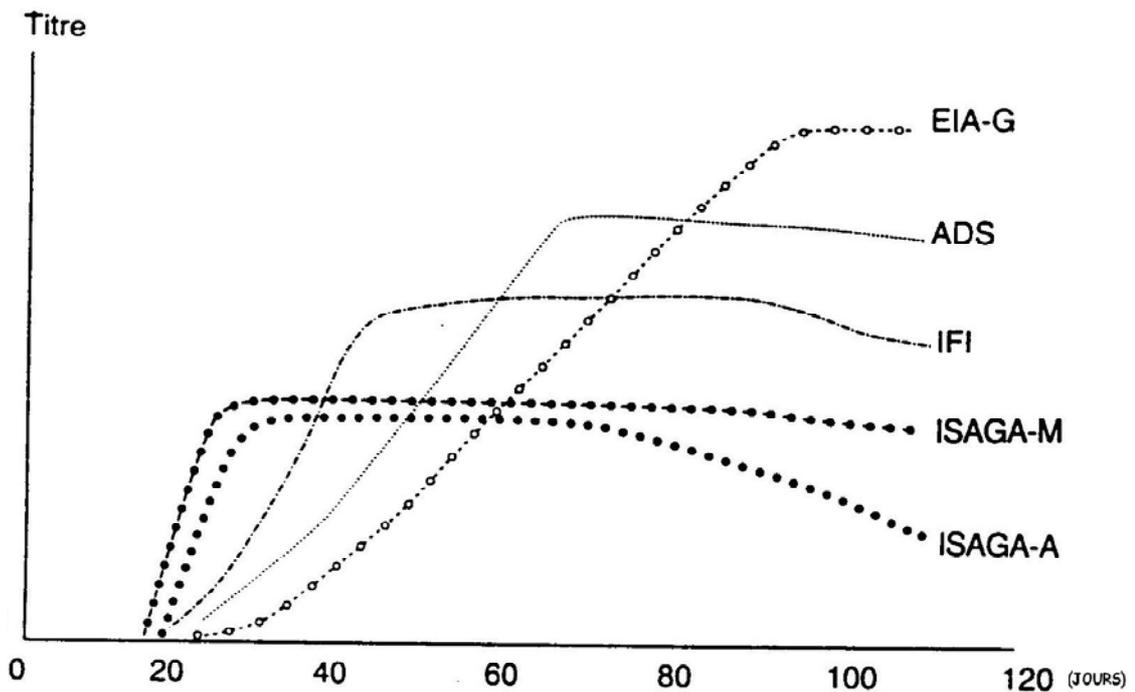
III.1.2.3 – Les autres isotypes

L'étude des isotypes IgA et IgE est un critère diagnostique supplémentaire dont l'avantage principal est **l'absence d'IgA et d'IgE naturelles**. De plus, le facteur rhumatoïde et les anticorps antinucléaires n'interfèrent pas avec le dosage de ces isotypes.

La cinétique des IgA est moins prolongée que celle des IgM : elles apparaissent une quinzaine de jours après la contamination, atteignent un maximum entre 2 et 4 mois puis chutent rapidement. Les IgA sont rarement mises en évidence dans les toxoplasmoses anciennes, elles sont plutôt contemporaines de l'infection. Cependant, les variations individuelles de cinétique peuvent rendre leur interprétation délicate. Chez certains individus, comme pour les IgM, les IgA peuvent persister au-delà de 6 mois alors que chez d'autres il n'y a pas de synthèse d'IgA pendant la phase aiguë de l'infection. Cette éventualité se voit chez environ 5 % des sujets (Bessieres et al, 1992).

La présence d'IgE est également en faveur d'une infection récente. Leur cinétique est identique à celle des IgM, mais en général elles ne persistent pas au delà de 4 mois après la contamination (Pinon et al, 1990). Comme les IgA, les IgE sont soumises à des variations individuelles compliquant leur interprétation (Wong et al, 1993).

<p>La cinétique des anticorps dans la toxoplasmose est fonction de l'isotype considéré et de la technique utilisée. Les IgM sont les premières à apparaître après une contamination.</p>



Détection des IgM par ISAGA, des IgA par ISAGA-A, des anticorps totaux par immunofluorescence indirecte (IFI), des IgG par agglutination directe sensibilisée (ADS) et par technique immunoenzymatique (EIA-G).

Figure 5. Courbes d'évolution des anticorps spécifiques de *Toxoplasma gondii*, au cours d'une séroconversion, selon différentes techniques (Puech et al, 1996).

III.1.3 – Interprétation de la sérologie maternelle

L'interprétation des résultats se fait en fonction de :

- la présence ou l'absence d'IgM spécifiques,
- la présence ou l'absence d'IgG spécifiques,
- de la cinétique des IgG qui permet de préciser le stade évolutif de l'infection, notamment lorsque les IgM sont positives. Cependant, pour un sérum le titre d'anticorps, même exprimé en UI, 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. Ce titre doit être impérativement exprimé par rapport à une valeur seuil de la technique utilisée permettant d'indiquer l'absence ou la présence d'anticorps spécifiques.

- la présence ou l'absence d'IgA spécifiques.

Classiquement on distingue 4 situations :

III.1.3.1 – L'absence d'IgG et l'absence d'IgM

Cette situation correspond au profil sérologique d'une femme non immunisée : elle est alors incluse dans le groupe à risque de toxoplasmose congénitale. Un dépistage mensuel, le jour de l'accouchement et un mois après ainsi que des mesures prophylactiques s'imposent.

III.1.3.2 – La présence d'IgG et l'absence d'IgM

Le plus souvent cette situation correspond au profil sérologique d'une femme immunisée ayant contractée une toxoplasmose ancienne, ne nécessitant pas de contrôle ultérieur. **Ce résultat doit être confirmé sur un deuxième sérum**, prélevé à un mois d'intervalle, qui va montrer la stabilité du titre des IgG. En cas d'ascension du titre, il peut s'agir d'une **réactivation** toxoplasmique (les IgG sont d'emblée très élevées), ou d'une **réinfestation** (rebond sérologique) sans risque pour le fœtus. Toutefois, des cas de toxoplasmoses congénitales, suite à une réinfestation durant la grossesse chez des femmes apparemment immunocompétentes, ont été rapportés (Gavinet et al, 1997). Le mécanisme physiopathologique n'est certes pas complètement connu, mais plusieurs hypothèses subsistent :

- il peut s'agir d'une nouvelle contamination par une souche différente de la première,

- l'ingestion de kystes toxoplasmiques contenus dans les aliments ne protégerait pas la mère d'une éventuelle réinfestation par des oocystes. Ceci pourrait s'expliquer par les différences antigéniques entre les sporozoïtes et les bradyzoïtes décrites par Kasper (Kasper et al, 1984 ; Kasper, 1989).

La réinfestation se traduit sérologiquement par une ré-ascension des IgA, accompagnée d'un titre élevé d'IgG sans IgM.

De même, dans les cas de toxoplasmose chronique chez les femmes enceintes immunodéprimées, une surveillance étroite doit être assurée du fait d'une possible réactivation toxoplasmique à l'origine d'une transmission fœtale secondaire (Marty et al, 1994). Le contrôle immunitaire est principalement de nature cellulaire et chez ces femmes, l'état de prémunité lié à la persistance des kystes n'est plus assuré.

Plus rarement, une ascension significative du titre des IgG peut correspondre à une **séroconversion** toxoplasmique **sans IgM**. Il a été montré que dans ce cas une étude de l'avidité des IgG permettrait de différencier une réelle séroconversion d'une réactivation toxoplasmique (Cimon et al, 2002).

Le biologiste est également très fréquemment confronté à l'interprétation d'un taux limite ou très faible d'IgG antitoxoplasmique. Il est alors nécessaire de confirmer ce titre à l'aide d'une seconde technique. En effet, il n'y a pas de standardisation des réactifs commercialisés et le seuil varie d'une technique à l'autre. Si les deux tests sont

positifs, le résultat doit être confirmé par l'analyse d'un second sérum prélevé 3 semaines plus tard. En cas de discordance des résultats obtenus avec les deux techniques, il n'est pas possible d'affirmer le caractère ancien de l'infection toxoplasmique. La patiente est alors incluse dans le groupe à risque d'infection, ce qui impose un suivi sérologique mensuel et un rappel des mesures prophylactiques (Cimon et al, 2002).

III.1.3.3 – L'absence d'IgG et la présence d'IgM

Ce profil sérologique peut correspondre à 2 situations différentes :

- la possibilité d'une **infection récente**,
- la possibilité d'une **réaction non spécifique** : le pourcentage d'IgM non spécifiques n'est pas équivalent d'un test à l'autre. Les disparités dans l'apparition de faux positifs en IgM sont liées à des préparations antigéniques différentes et aux méthodes utilisées dans l'établissement du seuil de positivité (Liesenfeld et al, 1997).

Il est alors possible de réaliser sur le même sérum une seconde technique (type ISAGA-M) afin de détecter plus précocement ces anticorps. Une négativité du second test fait évoquer d'emblée une réaction faussement positive lors de la première technique. Dans un second temps, il est nécessaire de réaliser un contrôle sur un deuxième prélèvement à 10 jours d'intervalle en l'absence de tout traitement (risque de retard dans l'apparition des IgG en cas de séroconversion) afin de statuer en fonction de l'évolution des IgG. Leur ascension traduit une infection récente, alors que leur négativité permet d'exclure une séroconversion (profil sérologique correspondant à des IgM non spécifiques).

III.1.3.4 – La présence d'IgG et la présence d'IgM

La présence concomitante d'IgG et IgM constitue le cas de figure le plus difficile à interpréter : s'agit-il d'une infection ancienne avec persistance des IgM ou d'une infection évolutive ?

En présence d'une sérologie antérieure négative, la séroconversion est évidente. Elle est alors récente et **doit être confirmée immédiatement** sur un second sérum.

En l'absence de sérologie antérieure, un contrôle à 3 semaines d'intervalle, toujours en l'absence de tout traitement, doit être réalisé. Deux éventualités sont possibles :

- l'ascension significative des IgG traduit une infection évolutive,
- la stabilité du titre des IgG permet de situer la toxoplasmose avant les 2 mois qui ont précédé le premier prélèvement.

Dans tous les cas, il faut dater le plus précisément possible la contamination par rapport à la conception afin d'évaluer le risque de transmission et la gravité potentielle de l'atteinte fœtale. Pour cela il existe différents procédés :

1) étude de l'avidité des IgG

La principale indication de la mesure de l'avidité des IgG est l'observation d'un titre stable des IgG, associé à la présence d'IgM, ne permettant pas d'exclure l'hypothèse d'une infection pergravidique. Il s'agit d'un outil diagnostique considérable dans la datation de la séroconversion, permettant d'éviter des amniocentèses inutiles (Robert-Gangneux et al, 1998 ; liesenfeld et al, 2001). L'avidité, notion dérivée de l'affinité, exprime l'intensité de la liaison des anticorps d'un sérum pour des antigènes complexes. L'avidité des IgG augmente au cours de la réponse immunitaire humorale pour atteindre une valeur stable. Les IgG sont de faible avidité au début de l'infection toxoplasmique, elles sont de forte avidité en cas d'infection ancienne.

Des techniques ELISA indirectes sont adaptées à la mesure de l'avidité des IgG. Le principe est basé sur la comparaison de l'intensité des réactions obtenues, pour un même sérum, avec une technique ELISA classique et la même technique au cours de laquelle est introduit un agent dissociant la réaction antigène-anticorps (urée, guanidine, sodium dodécyl sulfate, dyéthylamine). Pour des anticorps de forte avidité les intensités de réaction sont très proches et correspondent à un **index élevé**, permettant de conclure à une **infection de plus de 20 semaines** (Lécolier et al, 1993). Au contraire, pour des anticorps de faible affinité, l'intensité de la réaction obtenue avec un agent dissociant est beaucoup plus faible que celle obtenue sans agent dissociant. **L'indice d'avidité est faible** et correspond dans la majorité des cas à une **infection antérieure à 20 semaines**. Selon les techniques, le seuil est variable. Ainsi il est fixé à 0.50 avec le Platelia Toxo IgG (Bio-Rad) et 0.3 avec la méthode automatisée sur le Vidas (bioMérieux).

Dans une étude conduite sur 7 ans, la mesure de l'avidité des IgG a permis d'exclure l'hypothèse d'une infection pergravidique dans près de 65 % des cas (Lécolier et al, 1993).

2) dosage des IgA

La présence d'IgA peut être une aide à la datation d'une séroconversion puisqu'un **taux élevé** est volontiers plus en faveur d'une **infection récente**. En effet, les IgA se négativent en général 7 à 8 mois après la contamination.

3) agglutination différentielle

Des sérums traités au 2-mercaptoéthanol, qui élimine les IgM, sont testés successivement avec 2 types de suspensions antigéniques :

- contenant des toxoplasmes formolés,
- contenant des toxoplasmes traités à l'acétone.

Dans une infection aiguë, les sérums agglutinent les deux types d'antigènes alors que dans une infection ancienne, ils agglutinent surtout les antigènes formolés (Dannemann et al, 1990).

L'absence d'IgM permet en général d'exclure une toxoplasmose récente. La présence d'IgM n'est pas obligatoirement synonyme d'infection récente. Il est nécessaire d'étudier la cinétique des IgG et des IgA afin de préciser le stade évolutif de l'infection. La mesure de l'avidité des IgG est un outil précieux dans la datation de l'infection.

III.2 – Les mesures hygiéno-diététiques

La circulaire D.G.S / DH du 27 septembre 1983 recommande aux médecins d'informer leurs patientes enceintes non immunisées sur les moyens de prévention contre la toxoplasmose. Elles comprennent :

- 1) l'ingestion de viande suffisamment cuite (une cuisson atteignant au moins 65°C dans toute l'épaisseur de la viande), d'éviter la consommation de viandes marinées, fumées ou grillées,
- 2) l'éviction des contacts avec les chats et leur litière, celle-ci devant être désinfectée régulièrement à l'eau de javel,
- 3) le lavage des crudités (fruits, légumes...), des plantes en contact avec la terre et destinées à la consommation,
- 4) éviter la consommation de crudités lors des repas pris en dehors du domicile,
- 5) le port de gants lors du jardinage,
- 6) le lavage soigneux des mains après avoir manipulé toute source potentielle de contamination : viande crue, légumes, fruits, ustensiles de cuisine, plan de travail...

Une étude menée en Belgique par Foulon entre 1979 et 2001 a montré que par l'usage d'une simple brochure d'information, il était possible de diminuer de 75 % le taux d'infestation pendant la grossesse. Les résultats de l'étude sont exposés dans le **tableau 7**.

Groupe d'étude	Nombre total	Séroconversion (en %)
Sans prévention 1979-1982	2986	1.43
Avec prévention 1983-1990*	8300	0.53
1991-2001**	16541	0.09

* : avec une information orale

** : avec une information orale et délivrance d'une plaquette d'information

Tableau 7. Pourcentage de séroconversions entre 1979 et 2001 en fonction du degré d'information concernant les mesures prophylactiques (Foulon et al, 2002).

De même au Canada, on a démontré qu'un programme d'éducation prénatale de 10 minutes peut modifier de façon significative les comportements vis-à-vis des chats, de l'alimentation et de l'hygiène personnelle (Carter et al, 1989).

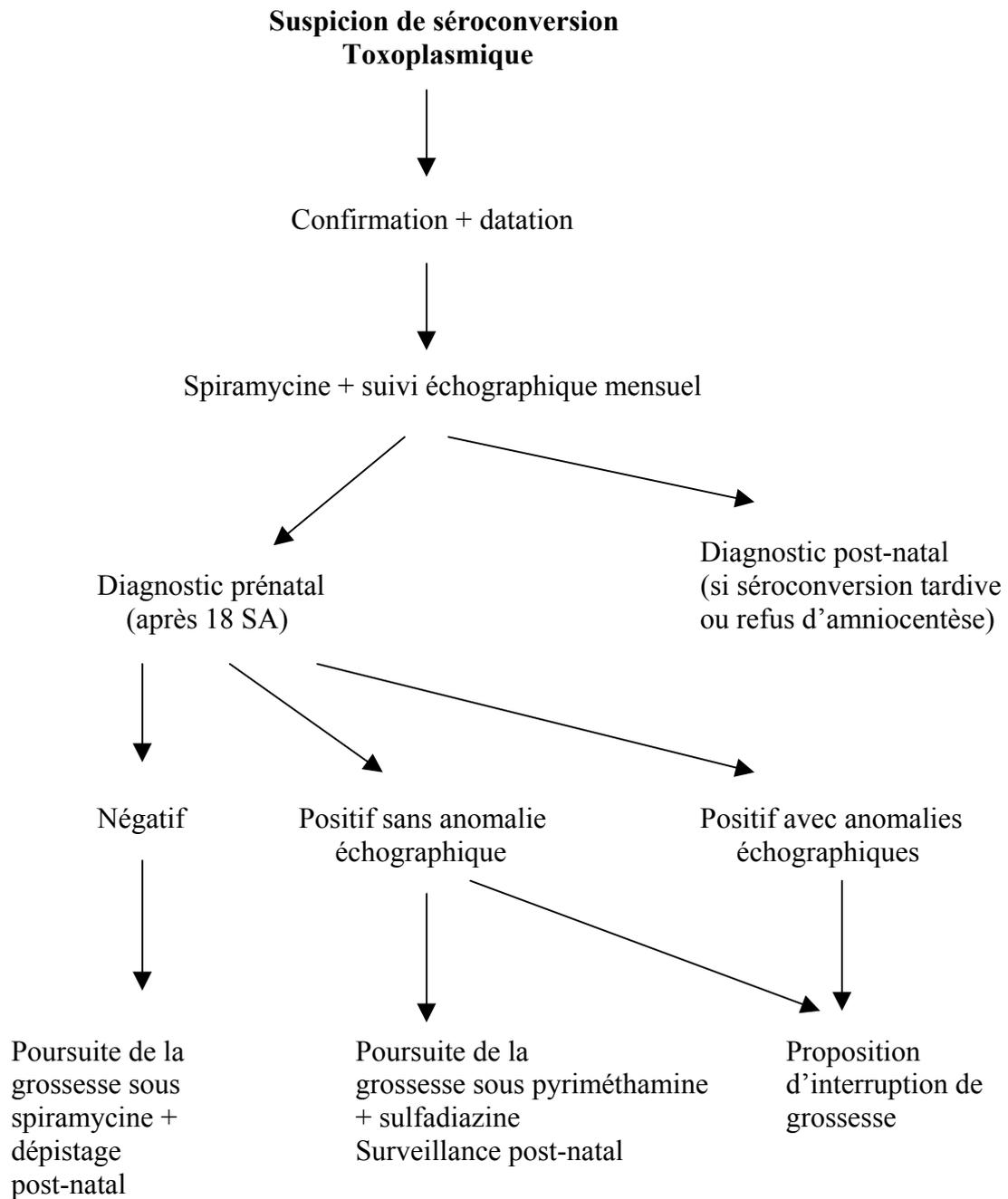
Des mesures hygiéno-diététiques simples permettent de diminuer significativement le risque de contamination.

IV – PREVENTION SECONDAIRE DE LA TOXOPLASMOSE

Elle repose sur deux attitudes pratiques :

- après confirmation et datation de la séroconversion, le suivi immédiat consiste à instaurer un traitement antiparasitaire,

- dans un deuxième temps, il est important de proposer un diagnostic anténatal et un dépistage post-natal afin d'évaluer l'atteinte fœtale (**Tableau 8**).



SA : semaine d'aménorrhée

Tableau 8. Arbre décisionnel de la gestion d'une séroconversion toxoplasmique en cours de grossesse (Robert-Gangneux et al, 2001).

IV.1 – Prise en charge d’une séroconversion maternelle

Dès lors que la séroconversion est avérée ou très fortement suspectée, l’attitude à adopter est de **mettre immédiatement la patiente sous traitement** antiparasitaire spécifique. En France, le traitement de première intention est la **spiramycine** (Rovamycine[®]). Elle est maintenue jusqu’à la fin de la grossesse à la dose de 3 fois 3 millions d’UI par jour.

La spiramycine est un antibiotique appartenant à la classe des macrolides. Elle inhibe la synthèse protéique en se fixant sur la sous unité 50S du ribosome des bactéries. Elle est efficace sur le toxoplasme mais le mécanisme d’action demeure inconnu. La spiramycine possède une excellente pénétration à l’intérieur des cellules phagocytaires et une bonne diffusion tissulaire notamment au niveau du placenta, sans être tératogène ou mutagène. Les effets secondaires sont essentiellement digestifs. Cependant, quelques rares cas d’érythème et de rash maculopapulaire ont été rapportés chez des femmes enceintes traitées par spiramycine (Nucera et al, 2002).

Tout retard thérapeutique doit être évité car il semble que le traitement diminue le taux de séquelles chez les nouveaux-nés. Dans une étude prospective multicentrique, Foulon met en évidence l’effet significatif de la prévention secondaire sur la gravité des séquelles, effet d’autant plus marqué que le traitement est administré précocement (Foulon et al, 1999a). Cependant, cet effet positif du traitement n’ayant pas été retrouvé dans une autre étude récente, il est nécessaire de poursuivre les investigations (Gras et al, 2001). De même, l’impact du traitement sur le taux global de transmission materno-fœtale n’est pas clairement défini (Couvreur et al, 1988b ; Gilbert et al, 2001).

Les différentes études tendent à prouver que le traitement par spiramycine possède une efficacité lors de la phase précoce de colonisation du placenta par les parasites, limitant la croissance parasitaire et le dommage fœtal s’il est instauré précocement.

IV.2 – Le diagnostic anténatal

C’est une étape importante conditionnée par la mise en évidence d’une séroconversion maternelle. Il permet de dépister *in utero* une éventuelle atteinte fœtale. Le diagnostic anténatal est proposé à la mère dans la plupart des cas mais il n’est généralement pas pratiqué lorsque l’infection survient tardivement en fin de grossesse. Il repose sur un suivi échographique et un diagnostic biologique de l’infection.

IV.2.1 – Le suivi échographique

Une échographie fœtale est pratiquée mensuellement afin de dépister précocement le développement éventuel d'anomalies fœtales. En effet, chez 89 fœtus infectés, une anomalie échographique est retrouvée dans 36 % des cas (Holhfeld et al, 1991). L'échographiste recherchera en particulier :

- des dilatations ventriculaires,
- la présence de zones hyperéchogènes dans le parenchyme cérébral,
- des calcifications intracrâniennes,
- un épaissement placentaire,
- une hépatomégalie avec des zones hyperéchogènes,
- une splénomégalie,
- un épanchement pleural ou péricardique,
- une ascite.

En revanche, les foyers de nécrose faiblement calcifiés et les chorioretinites sont souvent inaccessibles avec l'examen échographique.

IV.2.2 – Le diagnostic biologique

IV.2.2.1 – Prélèvement de liquide amniotique

Le diagnostic prénatal de la toxoplasmose se fait par **amniocentèse**. L'analyse du sang fœtal par cordocentèse n'est plus utilisée en raison du risque fœtal important (accouchement prématuré). L'amniocentèse est un examen qui consiste à prélever du liquide amniotique dans la poche des eaux dans laquelle évolue le fœtus. On réalise le prélèvement à l'aide d'une aiguille fine introduite à travers la paroi abdominale sous contrôle échographique. Le principal risque de l'examen, évalué à 1/200, est le déclenchement de l'accouchement de façon prématuré ou une fausse couche tardive.

En raison du délai de transmission du parasite à travers le placenta, une amniocentèse réalisée trop rapidement peut être faussement négative. **Le prélèvement de liquide amniotique est pratiqué 3 à 4 semaines après la date de séroconversion maternelle.**

La recherche du parasite sur culot de centrifugation du liquide amniotique peut se faire par inoculation à la souris, cultures cellulaires et par PCR (Polymerase Chain Reaction). En moyenne, un volume de 10 ml est utilisé pour chaque technique.

Un délai de 3 à 4 semaines après la date de séroconversion maternelle doit être respecté avant de pratiquer l'amniocentèse.

IV.2.2.2 – L'inoculation à l'animal

Plusieurs souris naïves sont utilisées pour l'inoculation intra-péritonéale *in vivo* du prélèvement de liquide amniotique. Une surveillance sérologique est instituée 3 semaines et 6 semaines après l'inoculation. Le sang est prélevé au niveau de la veine caudale et les anticorps spécifiques antitoxoplasmiques sont détectés le plus souvent par des techniques d'agglutination utilisant des conjugués anti-anticorps de souris. Si un virage sérologique est observé, la souris est sacrifiée. Après dissection, le diagnostic est confirmé par la mise en évidence, à l'examen microscopique entre lame et lamelle, de kystes toxoplasmiques intra-cérébraux (Desmonts et al, 1974). La sensibilité de cet examen varie de 53 à 74 % selon les équipes (Hezard et al, 1997 ; Robert-Gangneux et al, 1999a) et sa spécificité est excellente (100 %). Deux circonstances peuvent amener à diminuer la sensibilité de cette technique :

- une charge parasitaire faible dans le liquide amniotique,
- une quantité trop importante de parasites peut inhiber la réponse immunitaire chez la souris (Derouin et al, 1987).

L'inoculation doit se faire avec des toxoplasmes vivants. Ceux-ci peuvent être tués au cours du transport au laboratoire, lors de la préparation des échantillons ou par un traitement antiparasitaire, aboutissant à un résultat faussement négatif (Jenum et al, 1998). Cette observation constitue une limite à cette méthode, tout comme le délai de réponse qui est important : 5 semaines en moyenne.

Cependant, elle est toujours couplée à la PCR, ce qui permet d'avoir une **deuxième méthode de contrôle** essentielle au regard des conséquences du diagnostic. De plus cette technique permet d'isoler et de conserver les souches pour des études ultérieures.

IV.2.2.3 – Les cultures cellulaires

La culture du parasite peut être réalisée en routine sur cellules fibroblastiques de type MRC5. Cette technique nécessite des toxoplasmes vivants capables de pénétrer à l'intérieur des cellules. Ces cellules doivent constituer un tapis cellulaire de bonne qualité. Ces impératifs rendent la technique difficile à réaliser. Après 3 à 5 jours de culture, la croissance du parasite est visualisée par révélation immunoenzymatique ou immunofluorescente. L'interprétation est délicate et la sensibilité est inférieure à celle de la technique d'inoculation à la souris (Robert-Gangneux et al, 1999a).

IV.2.2.4 – La PCR ou Polymerase Chain Reaction

La technique d'amplification génique *in vitro* ou PCR a été introduite en France au début des années 90. Elle a apporté, outre **l'amélioration de la sensibilité**, un **gain de temps** considérable dans le délai de réponse (3 heures à 24 heures selon les techniques). Elle consiste à amplifier électivement une courte séquence d'ADN qui constitue une cible spécifique. Avec la diversité des cibles au sein de l'ADN toxoplasmique (gène B1, gène P30, ADN ribosomal, TGR1E), les techniques de PCR

se sont développées et elles sont évaluées pour une sensibilité et une spécificité optimales. Les principales techniques utilisées sont :

1) la simple PCR

Un seul couple d'amorces est utilisé. Les produits d'amplification sont révélés par le bromure d'éthidium, après migration électrophorétique sur gel d'agarose ou de polyacrylamide (Guay et al, 1993).

2) la PCR avec révélation des produits d'amplification par hybridation

Les produits de PCR obtenus après amplification de la séquence cible sont soit :

- soumis à une électrophorèse et à un transfert sur membrane de nitrocellulose : les amplicons sont révélés par autoradiographie après hybridation *in situ* avec une sonde marquée le plus souvent au phosphore 32 (Grover et al, 1990),
- directement hybridés à une sonde oligonucléotidique modifiée pouvant être détectée par des anticorps appropriés (Savva et al, 1990 ; Dupouy-Carmet et al, 1993b).

3) la « nested » PCR

Elle associe 2 PCR successives utilisant deux couples d'amorces différents. Des amorces internes amplifient une séquence située sur les amplicons issus de la première PCR qui utilise des amorces dites externes. Après électrophorèse sur gel d'agarose et un bain en présence de bromure d'éthidium, les amplicons sont identifiés par une bande fluorescente visible sur le gel (Jenum et al, 1998 ; Lin et al, 2000).

4) la PCR en temps réel

Elle permet de suivre en temps réel la cinétique de la réaction de PCR puisqu'elle associe amplification et détection des produits au cours d'une seule et même étape (Lin et al, 2000 ; Costa et al, 2001).

Malgré ces performances, la sensibilité globale de la PCR est de l'ordre de 70 à 85 % (Cazenave et al, 1992 ; Pratlong et al, 1996 ; Hezard et al, 1997) selon la plupart des études rétrospectives et de 97 % selon une étude prospective (Hohlfeld et al, 1994). Les faux négatifs peuvent être expliqués par un passage transplacentaire tardif (après l'amniocentèse) ou une charge parasitaire très faible, plutôt que par une défaillance technique. Comme a pu le montrer Robert-Gangneux, l'hypothèse d'une faible charge parasitaire qui diminuerait la sensibilité est vraisemblable. Sur une série de 110 cas de séroconversions toxoplasmiques en cours de grossesse, il observe que les fœtus « faux négatifs » en diagnostic anténatal ne présentaient aucun signe échographique jusqu'à la fin de la grossesse et étaient totalement asymptomatiques à la naissance. Inversement, tous les cas d'infection fœtale sévère, vraisemblablement liés à une charge parasitaire plus élevée, ont pu être détectés par PCR (Robert-Gangneux et al, 1999a). Le **tableau 9** regroupe les résultats constatés dans cette étude.

Statut clinique	Sensibilité de la technique en % (n/N)		
	Culture cellulaire	Inoculation à la souris	PCR
TC symptomatique n = 8	20 (1/5)	100 (6/6)	100 (8/8)
TC asymptomatique n = 13	11 (1/9)	27 (3/11)	61 (8/13)
Absence de TC n = 73	0	0	0

n : nombre d'échantillons positifs, égal à 94

N : nombre d'échantillons testés

TC : toxoplasmose congénitale

Tableau 9. Sensibilité des différentes techniques utilisées pour le diagnostic anténatal, en fonction de la sévérité de l'atteinte fœtale (Robert-Gangneux et al, 1999a).

De même, un traitement par spiramycine ou l'association pyriméthamine et sulfamides, interfère sur les résultats du diagnostic anténatal par PCR (Schoondermark et al, 1995 ; Foulon et al, 1999b). Cette observation n'est pas retrouvée dans l'étude menée par Romand, qui n'indique pas de baisse de sensibilité de la PCR avec un traitement par spiramycine (Romand et al, 2001).

La PCR est devenue la technique incontournable dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose de part sa sensibilité et sa rapidité de réalisation. On lui adjoint la technique d'inoculation à la souris qui permet de contrôler le résultat 3 et 6 semaines après.

IV.2.3 – Conséquence thérapeutique du diagnostic anténatal

La présence du toxoplasme dans le liquide amniotique, témoin de l'infection foetale, entraîne **une modification de la prise en charge thérapeutique**. Si la grossesse est poursuivie, le traitement fait appel à l'association **pyriméthamine** (Malocide[®], 50 mg/j) et **sulfadiazine** (Adiazine[®], 3g/j). Son action antitoxoplasmique a pu être montrée *in utero* et demeure supérieure en terme d'efficacité à la spiramycine seule (Couvreur et al, 1993b). Il convient d'y associer une supplémentation en acide folinique (Lederfoline[®], 50 mg deux fois par semaine) et une surveillance hebdomadaire de la numération formule sanguine, du fait de la toxicité hématologique de la pyriméthamine. En effet, cette molécule peut être responsable d'une anémie mégaloblastique, d'une neutropénie et d'une thrombopénie par carence en folates liée à l'inhibition de la dihydrofolate-réductase.

Les effets secondaires de la sulfadiazine sont essentiellement digestifs et neurologiques à type d'asthénie ou d'insomnie. Plus rarement, on peut observer des troubles cutanés (syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell), hématologiques (aplasie médullaire) nécessitant l'arrêt du traitement.

L'association pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar[®]) est moins utilisée (Villene et al, 1998).

Devant un diagnostic anténatal négatif, le traitement par spiramycine doit être poursuivi jusqu'au terme de la grossesse pour prévenir un éventuel passage transplacentaire tardif du parasite.

<p>L'association pyriméthamine et sulfadiazine se substitue au traitement par spiramycine en cas de diagnostic anténatal positif.</p>

IV.3 – Le bilan néonatal

La prise en charge du nouveau-né est capitale et doit être systématique dès lors que les examens sérologiques ont objectivé une séroconversion maternelle pendant la grossesse (voire précédant la conception de quelques mois), même si le diagnostic anténatal s'est avéré être négatif. L'observation d'environ 20 % de faux négatifs lors de cet examen justifie un suivi post-natal rigoureux des enfants à risque (Robert-Gangneux et al, 2001). Par ailleurs, le diagnostic anténatal n'est généralement pas pratiqué lorsque l'infection maternelle survient tardivement au cours de la grossesse. Or, le risque de transmission foetale augmente avec l'âge gestationnel et est estimé à 90 % pour les infections des 2 et 3 dernières semaines de grossesse (Couvreur, 1999).

IV.3.1 – Examen clinique

Il vise à rechercher des signes non spécifiques d'embryofoetopathies évolutives (hépatomégalie, splénomégalie, ictère, purpura thrombopénique, anémie) ou séquellaires (microcéphalie, hydrocéphalie, convulsions). En pratique, l'examen clinique est le plus souvent normal, les formes graves étant exceptionnelles en France grâce aux mesures de dépistage et de surveillance mises en place.

A la naissance, un **examen du fond de l'œil** est pratiqué à la recherche de lésions de chorioretinite. Il est systématique qu'il s'agisse d'une toxoplasmose congénitale certaine ou d'une séroconversion maternelle en cours de grossesse sans preuve de l'infection de l'enfant.

IV.3.2 – L'imagerie cérébrale

L'imagerie cérébrale néonatale repose sur l'échographie transfontanelle (Lebech et al, 1999). Elle présente l'intérêt d'avoir une excellente sensibilité, d'être facilement disponible et de ne pas nécessiter d'irradiations. Elle cherchera à montrer des calcifications intra-cérébrales et une hydrocéphalie. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire) et le scanner n'apportent pas d'informations supplémentaires par rapport à l'échographie.

IV.3.3 – Le diagnostic biologique néonatal

Le diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale à la 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 susceptibles de traduire une atteinte congénitale.

IV.3.3.1 – Diagnostic parasitologique

1) examen du placenta

La recherche du parasite dans le placenta se fait habituellement par inoculation à la souris d'après les recommandations de Desmonts (Desmonts et al, 1974). Ainsi, 1 à 2 ml de placenta prétraité sont inoculés à chacune des 10 souris, étape suivie d'un dépistage sérologique à 3 et 6 semaines sur sang ponctionné au niveau de la veine caudale.

La sensibilité de cette recherche est de l'ordre de 50 % (Bessieres et al, 1992 ; Faure et al, 1999 ; Naessens et al, 1999). Une étude insiste sur les conditions rigoureuses à respecter dans la réalisation de cet examen et rapporte une sensibilité de 94 % (Morin, 2002). Comme pour la PCR et le diagnostic anténatal, des études ont montré l'effet péjoratif des traitements sur la sensibilité de cet examen (Costa et al, 1994).

La recherche du parasite dans le placenta par PCR est en cours d'évaluation. La sensibilité de cette technique, de l'ordre de 60 % (Fricker-Hidalgo et al, 1998 ; Robert-Gangneux et al, 1999a) est supérieure à celle de la technique d'inoculation à l'animal.

Ce constat devrait permettre d'adapter la PCR à l'examen placentaire, mais d'autres études sont nécessaires du fait de la nature du placenta (milieu complexe) et du manque de standardisation des protocoles opératoires de biologie moléculaire.

2) inoculation du caillot du sang de cordon

Cet examen obéit également aux recommandations préconisées par Desmots (Desmots et al, 1974). Il est moins contributif au diagnostic de part sa sensibilité inférieure à celle de l'inoculation intra-péritonéale du placenta aux souris. Toutefois, un résultat positif (kystes intra-cérébraux chez la souris) pose le diagnostic de toxoplasmose congénitale avec certitude.

IV.3.3.2 – Diagnostic sérologique

Classiquement, le diagnostic sérologique repose sur la mise en évidence d'IgM et / ou d'IgA dans le sang de cordon ou le sérum du nouveau-né par une technique d'immunocapture (ISAGA le plus souvent). Cette situation n'est pas aussi simple en raison de la physiopathologie de la toxoplasmose congénitale qui complique considérablement le diagnostic sérologique. Les anticorps maternels (IgG) transmis physiologiquement au fœtus à travers le placenta, induisent une inhibition immunitaire spécifique du nouveau-né. 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. Ces deux observations ont permis de constater que 30 à 50 % des enfants ne présentaient pas d'IgM et/ou d'IgA antitoxoplasmique à la naissance (Fricker-Hidalgo et al, 1996 ; Robert-Gangneux et al, 1999a).

Le sérum du nouveau-né peut contenir des IgM et des IgA d'origine maternelle transmises accidentellement par effraction placentaire, ou éventuellement produites par l'enfant infecté. Les méthodes sérologiques doivent s'efforcer de les différencier. Par conséquent, **la présence de l'un et / ou de l'autre des isotypes dans le sang de cordon doit obligatoirement être confirmée dans le sang du nouveau-né à J8-J10.**

Une sensibilité d'environ 80 %, concernant la mise en évidence des IgM chez le nouveau-né, est retrouvée dans la plupart des études (Sibalic et al, 1990 ; Pinon et al, 2001). En ce qui concerne l'isotype IgA, les résultats sont plus controversés selon les auteurs. Certains considèrent que la recherche d'IgA à la naissance est plus sensible que la détection d'IgM, d'autres aboutissent au résultat inverse (Bessieres et al, 1992 ; Faure et al, 1999).

Pour résoudre en partie les difficultés d'interprétation sérologique, de nouvelles techniques ont vu le jour :

- le **Western Blot** ou immunoblot

Cette technique permet la comparaison des profils sérologiques mère-enfant. On utilise des bandes de nitrocellulose constituées d'un mélange d'antigènes de *Toxoplasma gondii* séparé par électrophorèse. Après incubation des sérums au contact des bandelettes, les différents anticorps spécifiques sont révélés par une méthode immunoenzymatique.

Ainsi, le western blot peut mettre en évidence dans le sang de l'enfant des anticorps de type IgG, IgM voire IgA ayant des spécificités antigéniques différentes de celles de la mère. La présence de bandes **retrouvées isolément** chez le nouveau-né **signe une néosynthèse d'anticorps** et donc une infection congénitale.

Dans une étude conduite sur 4 ans à l'hôpital Cochin, cette technique a montré une sensibilité de 94 % sur les diagnostics portés au cours des trois premiers mois de vie, ainsi qu'une excellente spécificité (Robert-Gangneux et al, 1999b). Elle a montré également que 78 % des enfants synthétisaient leurs propres IgG spécifiques dès la naissance. Cette étude souligne la nécessité de renouveler le Western Blot tous les mois en cas de séroconversion précoce ou au contraire très tardive.

Le Western Blot a permis d'améliorer significativement la sensibilité des méthodes sérologiques dans le diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale.

- la technique ELIFA (Enzym Linked Immuno Filtration Assay).

La technique d'électro-immunofiltration sur gel permet également de comparer les anticorps antitoxoplasmiques de la mère et ceux de son enfant par observation de profils d'arcs de précipitation des différents isotypes (IgG, IgM, IgA, IgE). Elle nécessite un équipement spécialisé. Sa mise en œuvre est délicate et n'est pas adaptée au diagnostic de masse. Sa sensibilité semble légèrement inférieure à celle du Western Blot (Pinon et al, 1996).

Le diagnostic néonatal est considéré comme positif :
- lorsque l'inoculation à la souris du placenta et / ou du sang de cordon est positive,
- en cas de détection d'IgM et / ou d'IgA antitoxoplasmiques dans le sang de cordon vérifiée sur le sérum du nouveau-né à J8-J10,
- lorsque le profil comparé des IgG et / ou IgM de la mère et de l'enfant est positif.

IV.3.4 – Le traitement et le suivi postnatal

IV.3.4.1 – Infection congénitale non prouvée à la naissance

L'absence d'argument formel en faveur d'une toxoplasmose congénitale (diagnostic anténatal négatif ou non réalisé, diagnostic biologique néonatal négatif, examen clinique, échographique et ophtalmologique normaux) conduit à une abstention thérapeutique puisque la prescription systématique de spiramycine a été abandonnée. Ceci n'exclut pas une surveillance sérologique instituée tous les mois au début puis tous les deux à trois mois pendant un an. Les IgG maternelles transmises au fœtus disparaissent entre le 6^{ème} et le 9^{ème} mois de vie. Donc, seule une sérologie à 1 an permet d'écarter définitivement le diagnostic de toxoplasmose congénitale. Aucune surveillance particulière de l'enfant n'est à respecter. **Au contraire, la persistance des IgG au delà de 1 an signe l'atteinte fœtale. De même, tout rebond sérologique avant l'âge de 9 mois doit être considéré comme une infection congénitale** dépistée tardivement, en raison d'une synthèse différée des IgG spécifiques de l'enfant.

Seule une sérologie de l'enfant à 1 an permet d'écarter ou d'affirmer définitivement le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

IV.3.4.2 – Toxoplasmose congénitale certaine

Le traitement post-natal a pour but de réduire la fréquence et la sévérité des séquelles à long terme (choriorétinite notamment). En France deux schémas thérapeutiques sont surtout utilisés. Le premier est proposé par le Chicago Collaborative Treatment Trial (**Tableau 10**).

La deuxième possibilité correspond à l'association sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar[®]). La posologie est d'un quart de comprimé pour 5 kg de poids tous les 7 à 15 jours selon la sévérité de l'atteinte et selon les auteurs (Peyron et al, 1996 ; Vellina et al, 1998). La durée habituelle du traitement est de 18 à 24 mois.

Pendant le traitement par pyriméthamine-sulfadiazine, les titres des IgG antitoxoplasmiques diminuent pour devenir nuls ou quasi nuls au bout de 9 à 12 mois. On observe dans 90 à 97.8 % des cas des rebonds sérologiques à l'arrêt du traitement mais la reprise du traitement ne semble pas justifiée (Wallon et al, 2001).

Traitement	Forme infra-clinique ou modérée	Forme sévère
Pyriméthamine* (Malocide®)	1 mg/kg/j pendant les deux premiers mois	1 mg/kg/j pendant les six premiers mois
	puis 0.5 mg/kg/j pendant le reste de l'année	
Sulfadiazine (Adiazine®)	100 mg/kg/j en 2 à 3 prises quotidiennes pendant 12 mois	
Acide folinique (Lerderfoline®)	50 mg en une prise per os / semaine pendant 12 mois	

* : en 3 à 6 prises hebdomadaires

Tableau 10. Schéma de traitement par association continue de pyriméthamine et sulfadiazine pendant 12 mois (McAuley et al, 1994).

Le suivi à moyen et long terme des enfants consiste à prévenir les effets secondaires des traitements : neutropénies, thrombopénies, manifestations cutanées allergiques. Un suivi ophtalmologique est nécessaire tous les 3 à 4 mois les deux premières années puis annuellement, car des lésions de chorioretinite ont été décrites comme apparaissant jusqu'à l'adolescence.

En France, les investigations menées dans le diagnostic anténatal et post-natal, dans la prise en charge de la mère et de l'enfant, ont profondément modifié le tableau clinique de la toxoplasmose congénitale et l'interprétation du risque encouru. Les IgM ont perdu leur valeur absolue de marqueur d'une infection aiguë. La datation de l'infection ne suffit plus à écarter formellement le risque de transmission comme le démontre de rares cas de toxoplasmoses congénitales consécutives à une infection maternelle proche de la conception. Le diagnostic anténatal permet d'éviter un grand nombre d'interruptions thérapeutiques de grossesse et de proposer un traitement maternofoetal efficace. La PCR permet un diagnostic rapide (de 3 à 24 heures selon les techniques) avec une grande sensibilité dans le recherche du parasite. Le diagnostic néonatal repose sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques et est incontournable dès lors qu'une séroconversion maternelle en cours de grossesse est objectivée.

Quelques laboratoires travaillent dans le but de concevoir un vaccin et ainsi de simplifier considérablement les problèmes liés à la toxoplasmose. Une souche de toxoplasme affaiblie par l'inhibition d'une enzyme clé dans la multiplication du parasite a été conçue, permettant d'envisager un éventuel vaccin vivant atténué. Aujourd'hui, les essais vaccinaux concernent surtout le domaine vétérinaire. Les vaccins étudiés n'empêchent pas la contamination animale mais diminuent le nombre de kystes dans la viande. En terme de transmission à l'homme, cette situation peut entraîner une diminution de la séroprévalence dans la population et par conséquent un accroissement du nombre de femmes séronégatives en âge de procréer.

Troisième chapitre :

La PCR en temps réel

INTRODUCTION

Le concept technologique de la réaction de polymérisation en chaîne, découvert par Mullis, a permis d'envisager à grande échelle l'application de cette technique au diagnostic des maladies infectieuses et parasitaires (Mullis et al, 1987). Elle fait son apparition en milieu hospitalier il y a une quinzaine d'années et la première application a été celle de la mesure de la charge virale plasmatique du virus de l'immunodéficience acquise.

A ce jour, tous les secteurs de la microbiologie sont concernés mais avec des retombées quotidiennes inégales. L'apport de la PCR pour le diagnostic est très important en virologie, croissant en bactériologie mais moindre en parasitologie.

Les raisons de ce retard sont multiples. La première est la taille et la complexité du génome des parasites et des champignons par rapport aux virus et aux cellules procaryotes. En effet, pour beaucoup d'espèces les séquences génomiques cibles pouvant servir aux techniques d'amplification et de typage ne sont pas identifiées.

La deuxième raison est liée au fait que les méthodes de diagnostic type examens directs, cultures, sérologies sont souvent efficaces, simples et peu onéreuses en parasitologie et en mycologie. Leur remplacement par les techniques d'amplification génique n'est justifié que lorsqu'elles sont peu performantes ou longues, notamment :

- pour certains **diagnostics d'urgence** (diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale, aspergilloses invasives, candidoses systémiques),

- en cas de **pauci parasitisme** ou pour le diagnostic d'une rechute survenant après traitement (pneumocystose, paludisme) où la recherche du parasite peut parfois être difficile et fastidieuse,

- pour des **études épidémiologiques** basées sur le génotypage (microsporidies, cryptosporidies).

Le troisième facteur limitant est d'ordre technique et économique en raison du coût du matériel et des réactifs nécessaires. Enfin, le manque de standardisation des procédures techniques de PCR, l'absence de contrôles de qualité limitent leur application en routine.

Au fur et à mesure des années, les techniques d'amplification génique n'ont cessé d'évoluer en terme de rapidité, d'automatisation et de détection des produits amplifiés. La PCR en temps réel est une illustration concrète des progrès effectués par un principe subtil et original.

I – PRINCIPE

I.1 – Rappels sur la PCR

Les techniques d'amplification conventionnelles représentent une révolution car elles permettent d'obtenir des dizaines, voire des centaines de nanogrammes d'une séquence d'ADN (ou d'ARN) dont on ne dispose que d'une infime quantité. Ces techniques sont basées sur la répétition de **réplication in vitro d'ADN** à partir d'amorces spécifiques et sous l'action d'une enzyme : la taq polymérase (ADN polymérase thermostable). Afin d'amplifier par réplifications successives une séquence d'ADN désirée, il est nécessaire de choisir des amorces oligonucléotidiques synthétiques. Celles-ci sont capables de s'hybrider à ses bornes et de réaliser les réplifications qui assureront la multiplication de la séquence encadrée par les amorces. Pour réaliser cette opération il est donc indispensable de connaître au préalable la séquence à amplifier. Le nombre de copies d'ADN est doublé à chaque cycle. Son augmentation est exponentielle puisque les produits d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Après 30 cycles, on obtient en moyenne une amplification de 10^6 selon la relation mathématique :

$$N = N_0 2^n$$

(Où : N est le nombre de molécules amplifiées au final, N_0 le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification).

Dans la pratique la PCR comprend trois étapes :

1) **la dénaturation** : l'ADN est chauffé à une température supérieure à sa T_m (température de fusion). Il s'agit en général d'une température de 94 ou 95°C. A ces températures l'ADN passe de double brins à simple brin.

2) **l'hybridation** : la température est abaissée (entre 40 et 70°C en fonction des couples d'amorces) à une valeur inférieure à la T_m de l'amorce possédant la plus faible température de fusion afin que les amorces puissent s'hybrider.

3) **l'élongation** : on augmente progressivement la température ce qui a pour conséquence d'activer la taq polymérase et la néosynthèse du brin complémentaire.

Une fois l'amplification terminée, la détection des produits de PCR obtenus (amplicons) nécessitent une nouvelle étape. Celle-ci par la manipulation des tubes contenant des quantités énormes de cibles est à l'origine de **contaminations**. Par opposition, la PCR en temps réel combine à la fois l'amplification de l'ADN cible et la détection des produits dans un même tube de réaction. Différentes technologies peuvent être utilisées.

La PCR en temps réel permet l'amplification et la détection de l'ADN cible à analyser au cours d'une seule et unique réaction. Par conséquent, l'absence de manipulation des produits amplifiés limite les problèmes de contamination et permet de réduire par la même occasion la durée de technique.

I.2 – Les technologies de la PCR en temps réel

I.2.1 – Technologie utilisant les sondes

La chimie des sondes est basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes et sur le principe du transfert d'énergie : **FRET** (pour Fluorescence Resonance Energy Transfer). Les fluorophores sont sensibles et influencés par leur environnement moléculaire et en particulier par d'autres chromophores. Ceux-ci peuvent « éteindre » le fluorophore voisin ou lui transférer son énergie (Ota et al, 1998).

I.2.1.1 – Méthode TaqMan

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une **sonde doublement marquée** avec un rapporteur (ou fluorophore donneur) et d'un bloqueur absorbeur d'énergie (ou *quencher* ou fluorophore accepteur), ainsi que l'utilisation de **l'activité exonucléasique de la polymérase** (Holland et al, 1991). La sonde spécifique se fixe sur le fragment d'ADN cible à amplifier. Les deux fluorophores étant rapprochés, il n'y a pas d'émission de fluorescence. L'énergie du fluorophore rapporteur excité par la source, est transférée par FRET au fluorophore accepteur. Comme les spectres d'émission et d'excitation ne se chevauchent pas, le fluorophore accepteur absorbe l'énergie qui lui est transmise mais n'émet aucune fluorescence. Au cours de la synthèse du brin complémentaire, la Taq polymérase digère la sonde ; les deux fluorophores se séparent interrompant le FRET. La séparation des deux fluorophores entraîne une émission de fluorescence qui se fait donc pendant la double étape d'*annealing*-élongation. Il s'agit du procédé utilisé au cours de nos manipulations.

I.2.1.2 – Le test d'hybridation (sondes LightCycler)

Cette technique requiert la présence de deux sondes : chacune marquée par un fluorophore différent (Caplin et al, 1999). Une des sondes est donneuse d'énergie alors que l'autre accepte l'énergie. Elles sont conçues pour reconnaître deux séquences adjacentes sur le fragment d'ADN amplifié, de telle sorte qu'elles soient distantes de 1 à 5 bases.

En l'absence de brin d'ADN cible, il n'y a pas d'amplification. Les sondes sont éloignées l'une de l'autre et aucune fluorescence n'est mesurable.

Au contraire, en présence d'ADN cible et au cours de l'amplification les deux sondes s'hybrident sur l'amplicon. La proximité de ces deux molécules entraîne un transfert d'énergie depuis la sonde donneuse vers la sonde accepteuse. Comme le spectre d'émission du fluorophore donneur chevauche le spectre d'excitation du fluorophore accepteur, le transfert d'énergie est alors direct et hautement efficace. L'énergie libérée par le fluorophore donneur est directement captée par le fluorophore accepteur de moindre énergie qui ainsi excité émet à son tour un signal fluorescent mesurable.

I.2.1.3 – Les sondes *beacon*

Ce principe est basé sur l'utilisation d'une seule sonde doublement marquée avec un rapporteur fluorescent en 5' et un bloqueur non fluorescent en 3'. L'originalité de la sonde *beacon* (pour lanterne ou balise phare) est liée au fait qu'elle possède une structure complémentaire lui permettant de se replier sur elle-même (Tyagi et al, 1996). Sous sa forme non liée à l'ADN, elle présente une **structure repliée (forme en boucle)**. Suite à l'excitation, le transfert d'énergie (FRET) s'effectue entre les deux molécules et le *quencher* absorbe l'énergie émise par le rapporteur : aucun signal n'est alors mesurable. En présence de la séquence cible complémentaire, la sonde spécifique s'apparie de façon spontanée à cette cible et subit un changement de conformation forçant les deux marqueurs à s'éloigner (**Annexe I**). Cet éloignement interrompt le FRET et permet ainsi au rapporteur d'émettre une fluorescence mesurable. A la différence du système TaqMan, le groupement *quencher* porté par l'extrémité 3' est une molécule non fluorescente comme par exemple le Dabcyl (ou rouge de méthyle). L'énergie captée par le Dabcyl est restituée sous forme de chaleur et non pas sous forme d'énergie lumineuse. Le principal avantage qui en découle est un bruit de fond considérablement réduit, d'où une sensibilité supérieure à celle des systèmes utilisant un *quencher* fluorescent.

La spécificité de détection est telle qu'elle permet de détecter des différences d'une seule base puisqu'en cas de mésappariement, touchant un seul nucléotide, l'hybridation de la sonde *beacon* n'a pas lieu. L'inconvénient majeur de ce procédé est la difficulté de conception des sondes (Cayouette et al, 1999).

I.2.2 – Technologie utilisant les intercalants (**Annexe II**)

Le principe est basé sur l'utilisation de marqueurs qui deviennent fluorescents après excitation et lors de leur fixation à l'ADN double brin. Le *sybr green* (SG, intercalant vert) est le plus utilisé des marqueurs car il donne un signal plus puissant que le bromure d'éthidium par exemple (Higuchi et al, 1992 ; Wittwer et al, 1997). Il se loge dans le sillon mineur double brin de l'ADN en cours de synthèse toutes les 10 bases environ. Au cours de la PCR, tout l'ADN devient simple brin après dénaturation. A ce stade, le SG ne se lie pas à l'ADN et par conséquent la fluorescence est faible.

Pendant l'« annealing », les amorces s'hybrident sur la séquence cible augmentant ainsi la fluorescence. Pendant la phase d'élongation, de plus en plus de SG se lie à l'ADN double brin néosynthétisé. La fluorescence augmente proportionnellement. Elle est enregistrée à la fin de la phase d'élongation après excitation du SG à 530 nanomètres. Cette mesure permet le suivi cycle par cycle de la réaction de PCR. Le système est simple, sensible, mais de spécificité réduite.

Le SG marque toutes les molécules d'ADN double brin qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence cible. De ce fait, tous les produits de PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorces éventuellement formés vont également engendrer un signal de fluorescence. L'autre inconvénient est lié à l'intensité de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin et donc à la taille des amplicons.

Le principe général de la PCR en temps réel repose sur l'utilisation de sondes ou d'intercalants fluorescents.

II – APPAREILLAGE

II.1 – Les systèmes

Il existe sur le marché plusieurs types d'instrumentations permettant de pratiquer la PCR en temps réel. Les appareils actuellement commercialisés peuvent être classés en 2 catégories (**Annexe III**) :

1) **les systèmes haut débit** qui permettent le suivi simultané d'au moins 96 réactions. On trouve :

- le Gene Amp 5700 Sequence Detector et l'ABI Prism 7000, 7700, 7900 Sequence Detector de chez Applied Biosystems (Tib Molbiol, Berlin, Germany). Ces deux appareils comportent 96 puits de réaction et nécessitent un volume d'essai de 20 à 100 µl.

- le MX 4000 Multiplex Quantitative PCR System de chez Stratagene. Il comporte 96 puits et permet de détecter jusqu'à 4 fluorophores différents dans une même réaction.

- le iCycler de chez Bio-Rad.

- le DNA Engine Opticon commercialisé par MJ Research.

2) **les systèmes à moindre débit mais plus flexibles** (autorisant l'utilisation de plusieurs technologies différentes). Sont disponibles :

- le LightCycler commercialisé par Roche Diagnostic (Meylan, France). Il comporte 32 capillaires pour les réactions et nécessite un volume d'essai de 5 à 40 µl. Cet appareil est plus polyvalent car il permet notamment la réalisation des tests d'hybridation. Il est plus rapide en terme de réalisation des tests de PCR.

- le Rotor-Gene (Corbett Research) qui est également un thermocycleur en temps réel permettant d'amplifier l'ADN. Nous le détaillerons dans la seconde partie de notre exposé puisqu'il s'agit de l'appareil utilisé au cours de nos manipulations.

- le Smart Cycler (Eurogentec).

II.2 – Thermocycleur et module de détection

Tous ces appareils combinent un thermocycleur et un module de détection fluorimétrique pilotés par une station de travail permettant l'acquisition et le traitement des données. Les systèmes haut débit fonctionnent avec un thermocycleur combinant une résistance électrique et un circuit de refroidissement. Les variations de température entre le centre et les bords de l'appareil sont partiellement jugulées par une enceinte équipée de bords chauffants. Certains appareils, au moyen de station de pipettage, permettent l'automatisation des étapes de pré et post-PCR.

Les systèmes à moindre débit sont équipés d'un thermocycleur à air pulsé, assurant une répartition plus homogène de la température d'un échantillon à l'autre. Cette homogénéité de la température est un paramètre très important puisqu'elle conditionne la précision et la reproductibilité des mesures.

Le **module de détection fluorimétrique** est composé d'une source lumineuse d'excitation et d'un système de détection des signaux de fluorescence émis. Trois types de sources excitatrices peuvent être employées :

- 1) un laser argon,
- 2) une lampe électronique LED pour *ligh emitting diode*,
- 3) une lampe halogène à filament de tungstène.

Les détecteurs disponibles sont également de trois types :

- 1) une caméra CCD (*charge coupled device*),
- 2) une barrette de photodiode,
- 3) un ou plusieurs photomultiplicateurs.

III – PRESENTATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La fluorescence émise au cours de la réaction d'amplification est collectée par un système de détection et monitorée via une station de travail informatique permettant d'acquérir et d'afficher les données mesurées. La représentation graphique des résultats se fait sous forme d'une **courbe exponentielle** ou **courbe sigmoïde d'amplification (Figure 4)** avec en ordonnée l'intensité de fluorescence émise et en abscisse le nombre de cycles de PCR.

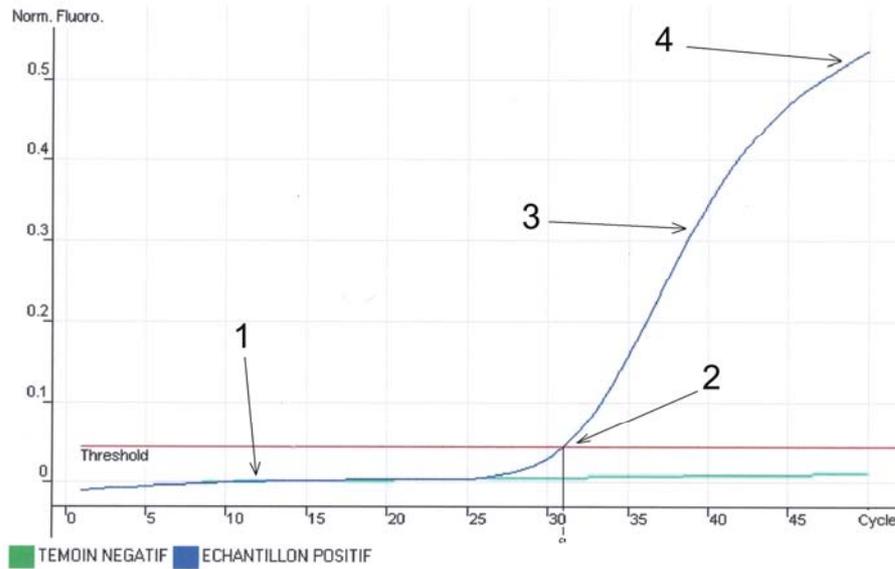
Pendant les cycles précoces de l'amplification, la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la **ligne de base** de la courbe qui indique l'intensité du bruit de fond de fluorescence (partie 1 de la courbe). Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de fluorescence. En prenant l'exemple de la méthode TaqMan, quand suffisamment de sondes ont été dégradées, l'intensité de fluorescence augmente (partie 3 de la courbe).

La partie 4 de la courbe correspond à la phase de saturation de la PCR. Au cours des derniers cycles d'amplification, la quantité de produits formés tend vers une limite : c'est l'**effet saturation** ou **effet plateau**. La phase de saturation reflète une baisse de l'efficacité d'amplification qui résulte (Morrison et al, 1994) :

- 1) en partie de l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase au cours des derniers cycles,
- 2) de la diminution des produits nécessaires à l'amplification (nucléotides, amorces) qui deviennent limitants,
- 3) de l'hybridation préférentielle de la cible avec elle-même plutôt qu'avec les amorces,
- 4) de l'accumulation de pyrophosphates qui sont des produits de réaction inhibant l'activité de l'ADN polymérase ; ils résultent de la dégradation des nucléotides.

Le *threshold* ou **ligne seuil** est défini arbitrairement. Elle est basée sur la variabilité de la ligne de base. Le point d'intersection entre la courbe d'amplification et cette ligne seuil est défini comme le **Ct** (*cycle threshold* ou **cycle seuil**) qui est lu sur l'axe des abscisses (partie 2 de la courbe). Plus précisément, le cycle seuil est le nombre fractionnaire de cycles pour lequel l'intensité de fluorescence émise a dépassé une valeur seuil, significativement différente du bruit de fond.

Représentation graphique des résultats



- 1: Ligne de base
- 2: Cycle seuil
- 3: Phase exponentielle de la PCR
- 4: Phase de saturation de la PCR

Figure 4. Cinétique de la réaction de PCR en temps réel : courbe sigmoïde d'amplification.

Les résultats sont représentés sous forme d'une courbe sigmoïde et peuvent être suivis en temps réel sur un écran. Pour un échantillon donné, le résultat s'exprime par le Ct ou cycle seuil correspondant au nombre de cycles d'amplification à partir duquel l'échantillon est considéré comme positif.

IV – LES APPLICATIONS DE LA PCR EN TEMPS REEL.

Depuis l'avènement de l'amplification génique *in vitro* ou PCR, les méthodes de diagnostic ont considérablement évolué dans le domaine de la microbiologie. La technologie de PCR en temps réel a grandement amélioré et simplifié la détection et la quantification des acides nucléiques. En biologie médicale, les applications sont très nombreuses ; les plus importantes se situent en microbiologie clinique, en oncologie et dans l'étude de l'expression des gènes.

IV.1 – La microbiologie clinique.

C'est en virologie que les progrès ont été les plus marqués et rapides. Actuellement, la PCR en temps réel est très utilisée dans la détection et la quantification des génomes viraux. Elle permet d'estimer la concentration d'une cible particulière d'ADN ou d'ARN. Nombreuses sont les applications qui en découlent. La technique est entre autre adaptée à l'HSV (Ryncarz et al, 1999), au VHC (Martell et al, 1999), au CMV (Nitsche et al, 2000), au VHB (Pas et al, 2000), au VIH2 (Schutten et al, 2000) et au VIH1 (Desire et al, 2001). La détermination de la charge virale du VIH dans le but d'évaluer l'efficacité des traitements, ou celle du virus de l'hépatite C, comme pronostic de réponse au traitement, sont deux exemples types.

La détection et la quantification d'agents pathogènes bactériens (Mycobactéries, Légionelles, Mycoplasmes, *Bordetella pertusis*, *Chlamydia*...), de protozoaires (*Toxoplasma*, *Plasmodium*), de fongis (*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*) par PCR en temps réel ont fait l'objet de plusieurs centaines de publications. Cet intérêt s'explique par la durée du diagnostic traditionnel qui s'exprime en jours voire en semaines et par la grande sensibilité de cette technique par rapport aux méthodes conventionnelles.

IV.2 – Oncologie clinique.

La PCR en temps réel est également très prometteuse dans la recherche et la quantification de gènes suppresseurs de tumeurs (par mutation ou délétion allélique), ou pour la recherche d'activation d'oncogènes (Bernard et al, 2002).

IV.3 – Expression génique.

La quantification par RT-PCR en temps réel est utilisée pour estimer le niveau d'expression de gènes d'intérêt comme les gènes de cytokines (Giulietti et al, 2001), ou pour l'analyse de variants d'épissage.

Le développement de la PCR en temps réel est en plein essor. Elle est de plus en plus utilisée dans le diagnostic microbiologique.

PARTIE II :

**APPLICATION DE LA PCR EN
TEMPS REEL DANS LE
DIAGNOSTIC ANTENATAL DE LA
TOXOPLASMOSE AU
LABORATOIRE DE
PARASITOLOGIE DE NANTES**

INTRODUCTION

Le diagnostic anténatal de la toxoplasmose, proposé il y a une quinzaine d'années par Daffos, comportait un prélèvement de liquide amniotique et de sang fœtal (Daffos et al, 1988). Les travaux de Hohlfeld ont montré qu'il pouvait se limiter à une amniocentèse et à la surveillance échographique (Hohlfeld et al, 1994). En effet, plusieurs études ont confirmé que la recherche d'ADN toxoplasmique dans le liquide amniotique est plus performante que dans le sang fœtal (Cazenave et al, 1992 ; Pratlong et al, 1996 ; Fricker-Hidalgo et al, 1997). C'est la réalisation des techniques d'amplification génique ou PCR qui a permis cette évolution. La biologie moléculaire a considérablement modifié les modalités du diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale. Cependant, malgré l'abondance des publications scientifiques dans ce domaine, on doit rester prudent quant à l'application de ces techniques de PCR au quotidien. La plupart d'entre elles nécessitent encore une évaluation plus approfondie et une meilleure standardisation.

La recherche d'ADN toxoplasmique dans le liquide amniotique par PCR permet de réduire le délai de réponse et d'augmenter la sensibilité par rapport à l'inoculation aux souris ou aux cultures cellulaires. Cependant, la technique d'inoculation à l'animal est toujours utilisée en complément de la PCR. Elle constitue une méthode de référence, de contrôle et permet de conserver les souches de parasites.

Différentes séquences cibles, au sein de l'ADN toxoplasmique, peuvent être amplifiées et utilisées en routine dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose (Jones et al, 2000) :

- la séquence TGR1E n'est plus utilisée (Christina et al, 1991),
- une séquence codant pour l'ADN ribosomal 18S, répétée une centaine de fois (Guay et al, 1993),
- le gène P30 codant pour l'antigène majeur de surface des tachyzoïtes (Weiss et al, 1991) : il est hautement conservé et spécifique de *Toxoplasma gondii* ; il est présent en copie unique sur le génome (Burg et al. 1988),
- **le gène B1** (Burg et al.1989) : il s'agit d'une cible attractive car elle est hautement spécifique, présente et conservée dans toutes les souches. Le gène B1 ne donne pas de réaction croisée avec l'ADN humain ou murin ni avec les autres parasites comme *Sarcocystis*, *Neospora caninum*, *Plasmodium falciparum*, *Echinococcus granulosus*, *Trichinella spiralis*. Il est répété 35 fois à l'intérieur du génome de *Toxoplasma gondii* dont l'ADN total correspond à 7.10^7 paires de bases (Cornelissen et al, 1984). Le gène B1 a été cloné à l'intérieur d'un plasmide vecteur p'AT153 selon la méthode de Maxam et Gilbert (Maxam et al, 1977). Sa séquence est aujourd'hui entièrement connue.

La PCR en temps réel représente la « nouvelle génération » des techniques de biologie moléculaire. Malgré son coût encore élevé en terme d'équipement, de maintenance, de réactifs, la PCR en temps réel présente bien plus d'avantages que de limites :

1) sa **rapidité** de réalisation avec une **diminution du délai** de réponse,

2) la technique assure **le suivi en temps réel de l'amplification** grâce à l'incorporation d'un marqueur fluorescent (sonde ou intercalant) et à la mesure du signal émis après chaque hybridation ou élongation.

Avec les progrès de la génomique et la disponibilité grandissante de données sur les séquences d'ADN, des amorces et des sondes fluorescentes très spécifiques ont été conçues. Elles servent à cibler des régions particulières du génome d'agents pathogènes. Elles présentent également l'avantage de permettre une grande évolutivité. De plus en plus de nouvelles molécules sont synthétisées et adaptées pour ces techniques. Un bloqueur type TAMRA peut être remplacé par des molécules plus efficaces et non fluorescentes comme par exemple le Dabcyl (Nasarabadi et al, 1999). La substitution de TAMRA par le Dabcyl permet d'obtenir un signal très élevé. Ainsi, on peut utiliser dans un même tube réactionnel plusieurs rapporteurs qui émettent une fluorescence à des longueurs d'ondes différentes. L'application qui en découle est la recherche ou la quantification de différents agents pathogènes dans une même et seule réaction.

3) les étapes de révélation sont considérablement simplifiées. La mesure de la fluorescence en temps réel se substitue aux étapes de migration sur gel ou aux techniques ELISA (Enzym Linked Immunology Sorbent Assay) de détection des amplicons. De ce fait, **l'absence de manipulation des produits amplifiés** limite les problèmes de contamination (amplicons des réactions antérieures).

4) la technique est **automatisée**, utilisable en routine,

5) la PCR en temps réel est **reproductible** et au moins aussi **sensible** que les autres techniques (Lin et al, 2000).

Au regard des nombreux avantages offerts par la PCR en temps réel, nous avons décidé d'appliquer cette technique aux liquides amniotiques dans le cadre du diagnostic anténatal de la toxoplasmose. La PCR-DEIA (DNA Enzyme ImmunoAssay) actuellement utilisée au laboratoire est réalisée en 8 heures environ, avec notamment une phase de révélation des produits amplifiés longue et comportant plusieurs étapes successives. La PCR en temps réel va permettre un rendu des résultats plus rapide (2 à 3 heures) et sans manipulation des produits amplifiés.

Dans un domaine où le diagnostic est capital, la sensibilité est un critère fondamental. Nous devons nous assurer que notre technique n'introduit pas de **perte de sensibilité** ni de spécificité par rapport à la PCR actuellement utilisée au laboratoire.

I – MISE AU POINT DE LA PCR EN TEMPS REEL DANS LE DIAGNOSTIC ANTENATAL DE LA TOXOPLASMOSE

Le point de départ de nos travaux est le transfert de connaissance entre le laboratoire de parasitologie de Toulouse du Pr Séguéla et le laboratoire de parasitologie de Nantes. Ils ont mis au point une PCR en temps réel adaptée au diagnostic de la toxoplasmose fœtale. Cependant, le CHU de Nantes dispose d'un Rotor-Gene (Corbett Research) dont le principe de fonctionnement (technologie TaqMan) est différent du LightCycler (Roche Diagnostic) utilisé à Toulouse (technologie des sondes d'hybridation). Il a donc fallu sélectionner dans la littérature les couples d'amorces et la sonde adaptés à notre automate. Une seule publication était alors sortie, celle de Lin (Lin et al, 2000).

Chronologiquement, la mise en place de la PCR en temps réel dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose sur liquide amniotique s'est déroulée de la façon suivante :

1) la première étape a consisté à déterminer les conditions optimales de la réaction de PCR en utilisant une solution non standardisée de toxoplasmes. Cette détermination préalable est indispensable afin de parvenir à une amplification sélective du fragment recherché avec une sensibilité optimale.

2) dans le but d'évaluer nos conditions opératoires, la technique est appliquée aux liquides amniotiques ponctionnés ou transmis au CHU de Nantes. Après comparaison des résultats de notre PCR versus PCR-DEIA actuellement utilisée au laboratoire, nous avons cherché à améliorer et optimiser de nouveau notre technique.

3) la sensibilité et la spécificité de la PCR sont déterminées dans ces nouvelles conditions en travaillant sur des dilutions successives d'une ascite de souris. Enfin, de nouveau, nous avons appliqué notre technique à la recherche de l'ADN toxoplasmique sur liquide amniotique.

I.1 – Matériels et méthodes

I.1.1 – Sources d'ADN

Nous avons utilisé une solution de toxoplasmes obtenue par ponction intrapéritonéale d'une ascite chez une souris ayant fait une toxoplasmose avérée après inoculation du parasite. Cette solution avait été congelée sans être standardisée. C'est pourquoi, parallèlement aux premières expérimentations nous avons relancé la production de la souche RH de toxoplasmes par passages successifs chez la souris afin de réactiver la souche. Au bout de 2 à 3 jours, le liquide d'ascite est ponctionné et inoculé à une seconde souris par voie intrapéritonéale. Cette souche possède la propriété de donner des formes végétatives (tachyzoïtes) sur ascite de souris.

Une autre source d'ADN est disponible avec les liquides amniotiques positifs analysés au CHU de Nantes, et congelés à -20°C.

I.1.2 – Extraction de l'ADN

Le kit d'extraction utilisé est le High Pure PCR Template Préparation Kit (Roche Diagnostic), basé sur le principe de la précipitation et de la purification de l'ADN sur colonne. Les étapes d'extraction sont décrites dans l'**annexe IV**.

I.1.3 – Techniques d'amplification génique utilisées au laboratoire de parasitologie

I.1.3.1 – La simple PCR

Elle correspond à la technique utilisée au laboratoire avant 1999. B26 et B27 sont les amorces qui ont été sélectionnées. Elles délimitent la zone à amplifier à l'intérieur du gène B1. Après amplification des différents échantillons dans le thermocycleur, la révélation comprend :

- une étape de migration électrophorétique des produits de PCR sur gel de polyacrylamide à 9 %,
- une étape de révélation proprement dite où les différentes bandes du gel sont visualisées sous une lampe à ultraviolets après un bain au bromure d'éthidium.

Un marqueur de poids moléculaire, un témoin positif et un témoin négatif de PCR sont déposés dans 3 puits du gel à la suite des échantillons à analyser. Les fragments d'ADN migrent différemment en fonction de leur poids moléculaire dépendant du nombre de nucléotides. Ainsi, les amplicons sont caractérisés par leur position sur le gel. Les résultats sont rendus après comparaison des bandes entre elles. Les produits d'amplification correspondant à un liquide amniotique positif migrent au même niveau que le témoin servant de contrôle positif.

I.1.3.2 – La PCR-DEIA (DNA Enzyme ImmunoAssay)

Il s'agit de la technique de PCR actuellement utilisée au laboratoire de parasitologie. Le kit utilisé est le GEN-ETI-KTM DEIA commercialisé par la société DiaSorin. Le principe est basé sur la détection immunoenzymatique de l'ADN (Mantero et al, 1991 ; Sakrauski et al, 1994). Cette technique se déroule en deux temps avec :

- une étape d'amplification utilisant les mêmes amorces B26 et B27,
- une étape de révélation sur plaque : la sonde oligonucléotidique, immobilisée sur la paroi des puits d'une microplaque grâce à une liaison streptavidine-biotine, s'hybride avec le produit d'amplification cible. Un anticorps monoclonal murin anti double brin d'ADN se fixe sur le couple sonde-cible. La révélation se fait après adjonction d'un traceur enzymatique (protéine A conjuguée à la peroxydase) et du substrat de l'enzyme. On mesure ensuite au spectrophotomètre la densité optique du mélange à 450 nm. Les résultats sont interprétés en fonction de l'absorbance obtenue par rapport à un seuil.

I.1.4 – Principe de la méthode TaqMan

Le procédé TaqMan utilise une **sonde fluorogénique**. Elle correspond à un fragment d'ADN monobrin, non extensible par l'ADN polymérase (absence d'extrémité 3'OH évitant sa propre élongation), spécifique du fragment cible à amplifier et portant deux groupements fluorophores. Le fluorophore est une molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse, de passer à un état excité et de restituer cette énergie sous forme d'une émission de fluorescence. Cette émission se fait lorsque le fluorophore excité retourne à son état initial (**Figure 6**).

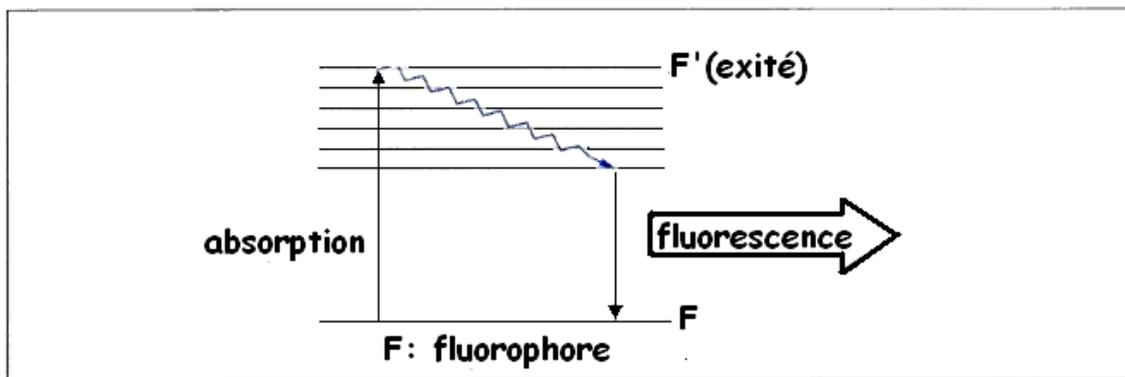


Figure 6. Mécanisme de fluorescence. Le fluorophore absorbe l'énergie lumineuse, passe par un état excité puis retourne à l'état fondamental avec émission de fluorescence.

Au cours d'un cycle d'amplification par PCR, l'émission de fluorescence mesurée ne doit se produire que lorsque la sonde s'est hybridée sur la cible spécifique. C'est pourquoi, un second fluorophore est fixé sur la sonde, proche du premier fluorophore. Cette seconde molécule va plus ou moins complètement absorber l'énergie émise par le fluorophore excité et réduire, voire empêcher, 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 (FRET)** entre une molécule électroniquement excitée (le fluorophore donneur) et une molécule voisine (le fluorophore accepteur, bloqueur ou *quencher*) (Clegg, 1995 ; Glazer et al, 1997). Suite à ce transfert d'énergie, le fluorophore donneur excité retourne à son état initial et l'énergie transférée au *quencher* est soit absorbée par ce dernier, soit dissipée dans le milieu sous forme de chaleur. Ce mécanisme de capture et de transfert d'énergie lumineuse est appelé **quenching**, pour extinction (**Figure 7**).

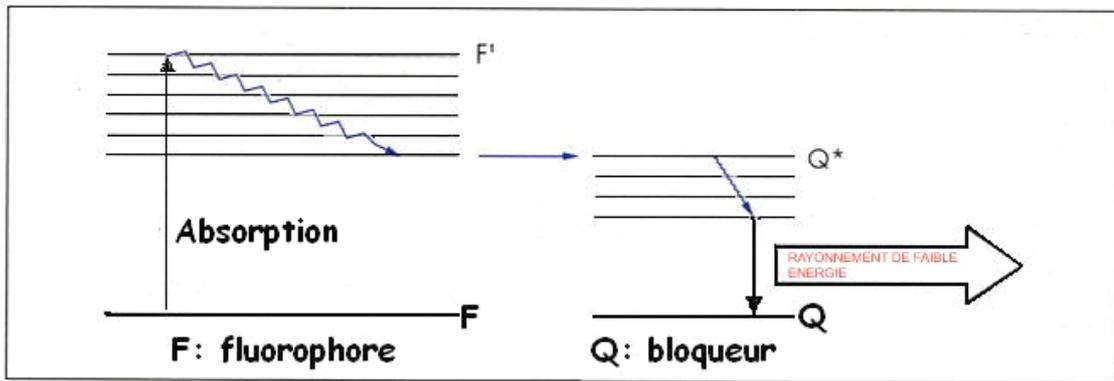


Figure 7. Mécanisme du quenching. Le fluorophore transfère son énergie au bloqueur (type TAMRA) qui s'excite à son tour puis retourne à un état plus stable avec émission d'un rayonnement de faible énergie.

TAMRA (6 carboxy-N.N.N'-tétraméthylrhodamine) en 3' et FAM (6 carboxy-fluorescéine) en 5' sont les marqueurs que nous utilisons, respectivement en tant qu'accepteur (ou bloqueur ou *quencher*) et rapporteur (ou fluorophore donneur). TAMRA est un dérivé de la rhodamine alors que FAM est un dérivé de la fluorescéine. Les sondes conçues sont de petite taille permettant à ces deux groupements fluorophores d'être proches l'un de l'autre. Ainsi, le transfert d'énergie est possible et hautement efficace.

Contrairement aux sondes LightCycler, le spectre d'émission du fluorophore donneur ne doit pas chevaucher le spectre d'excitation du fluorophore *quencher* qui ainsi n'émet aucune fluorescence (**Tableau 11**).

Spectre	Longueur d'onde (nm)
d'émission de FAM	494-518
d'excitation de TAMRA	565-580

Tableau 11. Propriétés spectrales de FAM et TAMRA.

Contrairement à une PCR classique, les étapes d'hybridation et d'élongation sont réalisées **à la même température**. Pendant l'élongation, l'activité 5'-3' exonucléasique de la polymérase dégrade la sonde fixée sur la séquence cible et relargue de petits fragments de sonde entraînant un éloignement des deux marqueurs, ce qui a pour conséquence d'interrompre le FRET. A chaque brin synthétisé, une molécule de FAM est libérée et la quantité de fluorescence émise par FAM est par conséquent directement proportionnelle au nombre de copies du gène amplifié (**Figure 8**).

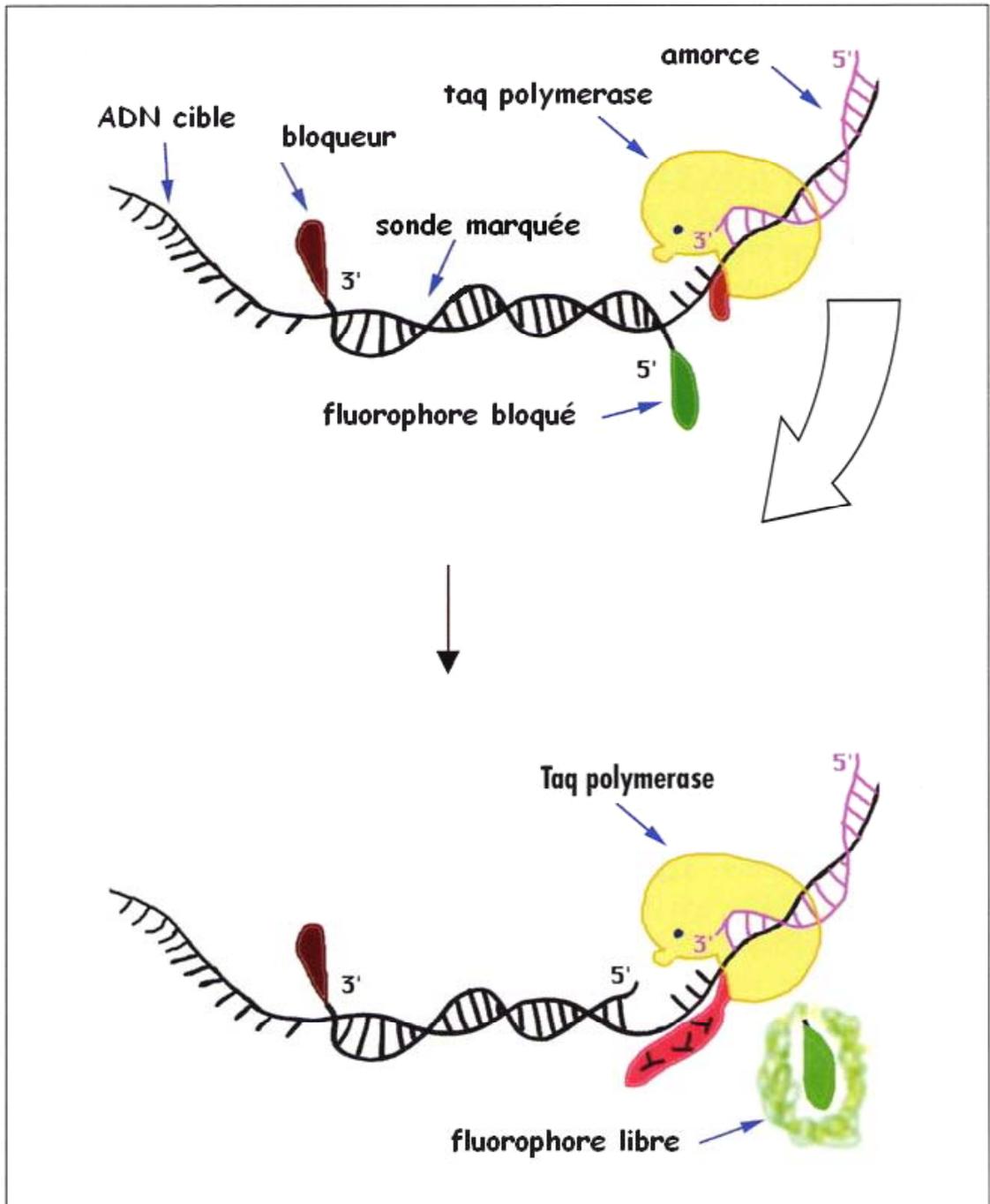


Figure 8. Principe de la PCR en temps réel utilisant la méthode TaqMan.

I.1.5 – Conditions de la réaction de PCR en temps réel

I.1.5.1 – Les amorces et la sonde TaqMan

Les amorces et la sonde pour la PCR en temps réel sont positionnées à l'intérieur du gène B1 et correspondent à celles décrites et utilisées par Lin (Lin et al, 2000). Les contraintes à respecter dans le choix du fragment à amplifier, des amorces et de la sonde sont les suivantes :

- 1) le fragment amplifié doit avoir une taille comprise entre 50 et 150 paires de bases (pb),
- 2) la position des amorces doit être relativement proche de la sonde sans la chevaucher,
- 3) la longueur de la sonde doit être comprise entre 20 et 30 bases,
- 4) la sonde ne doit former de dimères avec aucune des amorces. Elle ne doit pas contenir de guanine au niveau de l'extrémité 5', car un résidu guanine proche du fluorophore rapporteur bloquerait sa fluorescence même après clivage de la sonde.

-Les amorces :

En règle générale, pour le choix de la température d'hybridation des amorces, il est recommandé de se placer à une température inférieure de 4 à 5°C au T_m (Température de fusion) du couple d'amorces. Si le T_m est différent pour les deux amorces, on prend le T_m le plus bas comme point de référence.

TOXO F et **TOXO R** sont les amorces utilisées amplifiant 98 paires de bases à l'intérieur du gène B1 (**Annexe V**). Elles sont utilisées à la concentration de 2 µM. Les séquences nucléotidiques sont les suivantes :

TOXO F : 5'-TCC-CCT-CTG-CTG-GCG-AAA-AGT-3'

TOXO R : 5'-AGC-GTT-CGT-GGT-CAA-CTA-TCG-ATT-G-3'

Les autres caractéristiques sont regroupées dans le **tableau 12**.

Amorce	Position	Tm (°C)	Masse moléculaire (g/mol)	Conditions de stockage
TOXO F	783-802	66.0	6382.22	+4°C sous forme lyophilisée, -20°C dans un tampon ou à pH=8 dans l'eau
TOXO R	882-856	74.0	7688.07	+4°C sous forme lyophilisée, -20°C dans un tampon ou à pH=8 dans l'eau

Tableau 12. Position, température de fusion, masse moléculaire et conditions de stockage des amorces TOXO F et TOXO R.

-La sonde TaqMan :

La sonde TaqMan est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3'.

TOXO S est la sonde utilisée à la concentration de 5 µM. Elle possède la séquence nucléotidique suivante :

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

Des modifications sur la séquence de base ont été apportées. FAM et TAMRA sont greffés respectivement en 5' et 3'.

Les autres caractéristiques sont regroupées dans le **tableau 13**.

Sonde	Position	Tm (°C)	Masse moléculaire (g/mol)	Conditions de stockage
TOXO S	817-842	76.0	9144.36	+4°C sous forme lyophilisée, -20°C dans un tampon ou à pH=8 dans l'eau

Tableau 13. Position, température, masse moléculaire et conditions de stockage de la sonde fluorescente TOXO F.

I.1.5.2 – La Taq polymérase

La polymérase utilisée est la Hot PrimeTM « Hot Start » Polymérase de Q-Biogene. La concentration est de 5 U/μl. Son activation nécessite une incubation à 95°C pendant 15 minutes, inhibant ainsi toute activité prématurée au cours de la préparation des Mix.

I.1.5.3 – Les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP)

Les nucléotides sont utilisés à la concentration de 200 μM chacun. Des concentrations supérieures à 200μM pour chaque dNTP ne doivent pas être dépassées au risque d'augmenter le nombre d'erreurs d'incorporation. Des concentrations inférieures à 20 μM pour chaque dNTP peuvent, en revanche, diminuer le rendement de la réaction d'amplification.

I.1.5.4 – Le tampon 10X

La composition du tampon de dilution est la suivante :

TrisHCl.....	20 mM
pH.....	8
KCl.....	100 mM
EDTA.....	0.1 mM
Dithiothreitol.....	1 mM
Tween 20.....	0.5 %
Nonidet P40.....	0.5 %
Glycerol.....	50 %

Le tampon se conserve à -20°C.

I.1.5.5 – MgCl₂

Le magnésium (Mg²⁺) est un paramètre **essentiel à la spécificité et à l'efficacité de la réaction**. L'activité et la fidélité de la Taq polymérase sont particulièrement sensibles à la concentration en Mg²⁺ (cofacteur de l'enzyme). Des concentrations trop élevées facilitent la formation d'ADN double brin. En effet, Mg²⁺ interagit avec les charges négatives de l'ADN, limitant les forces de répulsion entre les brins d'ADN. Ainsi, en favorisant et en stabilisant l'hybridation, des appariements non spécifiques peuvent se produire. C'est le cas avec les amorces qui peuvent former des dimères. Au contraire, une concentration trop faible réduit l'activité de la polymérase. Il est donc nécessaire, pour chaque cible et pour chaque couple d'amorces, de déterminer expérimentalement la concentration optimale en MgCl₂ pour une concentration donnée en nucléotides, puisque ceux-ci complexent le magnésium.

I.1.5.6 – Automatisation et cycle de température

Nous utilisons le **Rotor-Gene** (Corbett Research) comme thermocycleur en temps réel. Sa description et son fonctionnement sont exposés en **annexe VI**. De part son mode de fonctionnement le système TaqMan utilise des conditions d'amplification particulières en deux étapes : une étape de dénaturation et une seconde étape, combinant hybridation et élongation, réalisée à une même température. Le programme de la PCR se déroule ainsi :

- **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 50 fois) :

- dénaturation à 95°C pendant 15 secondes,
- hybridation et élongation à une température **déterminée expérimentalement** pendant 60 secondes avec monitoring de la fluorescence.

I.2 – Résultats

I.2.1 – Optimisation des paramètres de la réaction de PCR en temps réel

Deux paramètres de la réaction de PCR sont déterminés expérimentalement : la concentration en MgCl₂ ainsi que la température d'hybridation et d'élongation. Afin d'étudier l'influence de ces paramètres sur notre PCR, nous sommes partis d'une ascite de souris qui avait été congelée sans être standardisée. Avec une telle solution, la quantification des toxoplasmes après congélation est difficile. Les tachyzoïtes sont très souvent altérés et morphologiquement peu reconnaissables. Notre objectif est de comparer les résultats obtenus en faisant varier la concentration en MgCl₂ ou la température au moyen de solutions obtenues à partir d'une même ascite de départ.

Cette solution mère est diluée de 10 en 10, 7 fois au total. La solution 1 est 10 fois moins concentrée, la solution 2, 100 fois moins et ainsi de suite jusqu'à la solution 7 qui est 10^7 fois moins concentrée que la solution de départ.

I.2.1.1 – Détermination de la température optimale d'hybridation et d'élongation

La première température testée est 60°C puisqu'il s'agit de la température utilisée par Lin au cours des amplifications en temps réel. A 60°C, nos résultats sont négatifs (Ct nuls). De même, tous les Ct sont négatifs à 66°C. Par conséquent, nous avons testé quatre températures intermédiaires correspondant à 62°C, 63°C, 64°C et 65°C.

Parallèlement, pour chaque température nous avons testé une concentration en $MgCl_2$ de 3, 4 et 5 mM. Ce sont les concentrations couramment utilisées au cours des réactions de PCR.

Les résultats sont regroupés dans le **tableau 14**.

Température		62°C		63°C			64°C		65°C	
Concentration en $MgCl_2$ (mM)		3	4	3	4	5	3	4	3	4
Solution 1	10	38.54	39.21	31.04	38.02	45.03	NR	NR	31.76	30.87
Solution 2	10^2	NR	33.57	33.31	36.5	43.18	36.15	39.63	30	29.77
Solution 3	10^3	41.43	41.78	37.05	45.3	47.56	40.85	44.14	32.83	33.29
Solution 4	10^4	NR	45.71	43.31	45.77	NEG	NR	48.96	36.07	40.69
Solution 5	10^5	44.55	45.33	41.52	49	NEG	45.14	49.82	36.87	41.02
Solution 6	10^6	48.7	49.84	44.29	NEG	NEG	49.8	NEG	40.92	43.48
Solution 7	10^7	NEG*	NEG	47.49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	47.78
toxoplasmes	<u>Facteur de dilution</u>	Ct (en nombre de cycles)								

NR : non réalisé

* : Ct négatif

Tableau 14. Résultats de l'optimisation des conditions de la PCR en temps réel : température d'hybridation et d'élongation.

Comparativement aux autres températures, pour une même concentration en MgCl₂, les Ct les plus faibles sont obtenus à 65°C.

La température retenue est de 65°C.

I.2.1.2 – Détermination de la concentration optimale en MgCl₂

Nous avons retenu deux concentrations en MgCl₂, **3 et 4 mM** pour lesquelles les Ct sont les moins élevés. **A la température de 65°C**, 2 nouveaux essais sont effectués avec les mêmes solutions afin de déterminer la meilleure concentration en MgCl₂.

Les résultats sont regroupés dans le **tableau 15**.

Concentration en MgCl ₂		1 ^{ère} amplification		2 ^{ème} amplification		3 ^{ème} amplification	
		3 mM	4 mM	3 mM	4 mM	3 mM	4 mM
Solution 1	10	31.76	30.87	NR	NR	NR	NR
Solution 2	10²	30	29.77	27.6	29.01	27.58	30.73
Solution 3	10³	32.83	33.29	31.29	34.17	31.98	35.92
Solution 4	10⁴	36.07	40.69	34.62	36.9	35.69	38.58
Solution 5	10⁵	36.87	41.02	NR	39.76	36.36	41.53
Solution 6	10⁶	40.92	43.48	NR	43.41	42.39	44.62
Solution 7	10⁷	NEG*	47.78	NR	NR	NR	NR
toxoplasmes	<u>Facteur de dilution</u>	Ct (en nombre de cycles)					

NR : non réalisé

* : Ct négatif

Tableau 15. Résultats de l'optimisation des conditions de la PCR en temps réel : concentration en MgCl₂.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec une concentration de 3 mM puisque les Ct correspondant sont les plus faibles.

Pour nos tests de PCR en temps réel à venir, **la concentration en MgCl₂ est fixée à 3 mM.**

Pour notre PCR en temps réel nous utilisons une température d'hybridation et d'élongation de 65°C et une concentration en MgCl₂ de 3 mM.

I.2.2 – Application de la PCR en temps réel aux liquides amniotiques selon le protocole initial.

Afin de tester notre technique dans les conditions prédéfinies, nous avons appliqué notre PCR en temps réel aux liquides amniotiques.

Les échantillons analysés correspondent à des liquides amniotiques ponctionnés chez des femmes ayant fait une séroconversion pergestationnelle. **25** liquides amniotiques étiquetés **positifs** et **5** liquides amniotiques étiquetés **négatifs** sont sélectionnés en fonction des résultats obtenus avec la PCR-DEIA, l'inoculation à la souris et les cultures cellulaires (**Annexe VII**).

L'ensemble du protocole opératoire initial appliqué aux liquides amniotiques est présenté en **annexe VIII**.

Dans notre démarche, nous comparons nos résultats à ceux obtenus avec la PCR-DEIA actuellement utilisée au laboratoire (**Tableau 16**).

I.2.2.1 – Résultats

	PCR en temps réel	PCR-DEIA
Liquides amniotiques positifs	14	25
Liquides amniotiques négatifs	16	5
Total	30	

Tableau 16. Comparaison des résultats obtenus avec la PCR en temps réel versus PCR-DEIA.

Par rapport à la PCR-DEIA, **37 % des résultats sont discordants**

Les 19 liquides amniotiques qui n'ont pas donné de résultats discordants ont été testés 1 fois, à l'inverse des 11 autres qui ont tous été analysés au moins une seconde fois afin de confirmer les résultats. Il s'agit des liquides amniotiques **1, 2, 3, 11, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 25**. Le **tableau 17** récapitule les différentes données concernant ces 11 échantillons.

I.2.2.2 – Conclusion

Pour 11 liquides amniotiques, la PCR en temps réel donne un résultat négatif bien qu'ils aient été répondeurs positifs. L'étude approfondie des dossiers biologiques concernant ces liquides amniotiques discordants a permis d'évoquer une éventuelle réponse **faussement positive** pour 5 d'entre eux. En effet, pour les liquides amniotiques **1, 11, 12, 13, 14**, les souris sont toutes sérologiquement négatives à 3 et 6 semaines ainsi que les cultures cellulaires. De plus, les densités optiques obtenues avec la PCR-DEIA sont très proches du seuil de la technique (mais légèrement supérieures), au terme de l'amplification et de la détection de l'ADN extrait de ces 5 liquides amniotiques. L'hypothèse d'une **mauvaise conservation de l'ADN** toxoplasmique à -20°C est également plausible puisqu'il s'agit d'échantillons datant de 1999 et 2000. Il a effectivement été montré que la sensibilité de la PCR pouvait diminuer après congélation. De même, une conservation des toxoplasmes à +4°C pendant 48 heures pourrait affecter la sensibilité de la PCR (James et al, 1996).

Les 5 liquides amniotiques sont testés 2 fois, au cours de 2 amplifications en temps réel distinctes, sans jamais donner de résultats positifs. Ils seront testés de nouveau lors de notre deuxième application aux liquides amniotiques selon le protocole définitif afin d'apporter une réponse plus précise.

La présence d'un inhibiteur de la réaction de PCR est possible. La nature même du liquide amniotique fait qu'il peut être partiellement inhibiteur de la réaction de PCR (Grover et al, 1990). De plus, l'isopropanol utilisé dans l'étape d'extraction comme agent précipitant de l'ADN est également susceptible d'inhiber l'ADN polymérase. Pour les 6 autres liquides amniotiques (**2, 3, 19, 20, 21, 25**) nous avons réalisé 3 dilutions de chaque extrait au 20^{ème}, 40^{ème} et 80^{ème}. L'action de l'inhibiteur est d'autant plus faible que le prélèvement est dilué. La recherche de l'ADN toxoplasmique par notre technique appliquée à ces dilutions est toujours ressortie négative. Pour ces 6 liquides amniotiques, les résultats négatifs obtenus avec la PCR en temps réel ne semblent pas liés à la présence d'un inhibiteur de l'ADN polymérase.

Un problème dans l'extraction de l'ADN est également envisageable. Il s'agit de l'hypothèse qui nous a semblée la plus probable et que nous avons retenue pour les 6 liquides amniotiques cités précédemment. La paroi du tachyzoïte est relativement résistante de part sa structure et sa composition. Cette propriété conditionne le choix du tampon de lyse dans l'étape d'extraction de l'ADN. Il est donc possible que le tampon du kit d'extraction Roche ne soit pas suffisamment « puissant » pour lyser complètement les toxoplasmes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé une seconde méthode d'extraction. Il faut également souligner l'altération possible du kit au cours du temps (mauvaise conservation des réactifs).

Hypothèse évoquée : liquides amniotiques faussement positifs							
Liquide amniotique	Année	Culture cellulaire	Inoculation à la souris	PCR-DEIA		PCR en temps réel	
				DOe / DOs	Résultat	Nombre d'essais	Résultat
1	1999	NEG	NEG	0.55/0.18	+	2	-
11	1999	NEG	NEG	0.23 / 0.21	+	2	-
12	1999	NEG	NEG	0.19 / 0.17	+	2	-
13	1999	NEG	NEG	0.9 / 0.17	+	2	-
14	2000	NR	NEG	0.20 / 0.16	+	2	-

Hypothèse évoquée : problème dans l'extraction de l'ADN							
Liquide amniotique	Année	Culture cellulaire	Inoculation à la souris	PCR-DEIA		PCR en temps réel	
				DOe / DOs	Résultat	Nombre d'essais	Résultat
2	1999	NEG	NEG	>3	+	5	-
3	1999	POS	POS	>3	+	5	-
19	2000	NEG	NEG	>3	+	5	-
20	2001	NEG	POS	2.16 / 0.16	+	5	-
21	2001	NR	DCD	>3	+	5	-
25	2002	NR	POS	>3	+	5	-

Légende :

NEG, - : résultat négatif

POS, + : résultat positif

NR : technique non réalisée

DCD : souris décédées en quelques jours

DOe : densité optique de l'échantillon analysé

DOs : densité optique seuil

>3 : densité optique élevée (overflow), supérieure à la limite de détection de la méthode.

Tableau 17. Synthèse des résultats des 11 liquides amniotiques posant un problème et leur classement en fonction de l'hypothèse la plus probable.

I.2.3 – Optimisation de la technique

I.2.3.1 – L'étape d'extraction

Le procédé d'extraction actuellement couplé à la PCR-DEIA est propre au laboratoire de parasitologie. Il est différent du procédé commercialisé par Roche Diagnostic que nous avons adopté. Son principe repose sur l'utilisation de la chaleur et d'un mélange de plusieurs composés (tampon de lyse).

Le protocole opératoire d'extraction est le suivant :

◆ Préparation du tampon d'extraction :

- * 100 ml d'eau distillée
- * 10 µl d'hydroxyde de sodium
- * 50 µl de NP40
- * 50 µl de TWEEN 20

La préparation est stable durant 8 jours.

- ◆ chaque culot de centrifugation est repris par 25µl de tampon d'extraction,
- ◆ chauffer 5 minutes à 100°C,
- ◆ centrifuger 5 minutes à 14000 tours /min à la température de 12°C,
- ◆ décanter le surnageant.

Actuellement, un liquide amniotique transmis au laboratoire est centrifugé afin d'obtenir un culot. Pour un liquide amniotique, on essaye d'obtenir au moins 3 culots, le premier est congelé à -20°C, le second est congelé à -80°C (obligation légale). Le troisième est utilisé pour l'extraction de l'ADN toxoplasmique par la chaleur en présence du tampon de lyse. Après prélèvement d'un volume nécessaire à l'analyse, l'extrait est le plus souvent possible congelé à -20°C. Pour les liquides amniotiques **2, 3, 20 et 21**, nous avons retrouvé les 4 extraits correspondant qui avaient été utilisés puis congelés en 1999 et 2001.

Les 4 extraits concernés sont utilisés pour l'amplification et la détection de l'ADN toxoplasmique en temps réel dans les mêmes conditions de réaction (65°C et MgCl₂ à 3 mM) que leurs homologues extraits avec le High Pure PCR Template Préparation Kit (Roche Diagnostic). Nous obtenons **3 résultats positifs** correspondant aux échantillons **3, 20, 21 (Tableau 18)**.

Pour le liquide amniotique **2** nous n'avons pas obtenu de résultat positif.

Source d'ADN	Procédé d'extraction	
	Kit Roche Diagnostic	Par la chaleur
	Culot de centrifugation congelé à -20°C	Extrait congelé à -20°C (année 1999 ou 2001)
2	-	-
3	-	+
20	-	+
21	-	+
Liquide amniotique	Résultat de la PCR en temps réel	

Tableau 18 : Résultats de la comparaison des 2 procédés d'extraction : analyse de 4 liquides amniotiques.

Pour les liquides amniotiques **19** et **25** qui posent un problème, nous n'avons pas retrouvé d'extraits congelés mais des culots de centrifugation. Pour chaque prélèvement, deux culots supplémentaires (2 et 3) sont disponibles. Ils avaient été congelés respectivement en 2000 et 2002. Notre démarche consiste dans un premier temps à extraire l'un des culots avec le procédé utilisant la chaleur et l'autre avec le kit Roche Diagnostic. Dans un second temps, nous comparons les résultats obtenus suite à l'analyse des différents extraits par la PCR en temps réel dans les mêmes conditions de réaction déterminées expérimentalement (**Tableau 19**).

Source d'ADN	Procédé d'extraction		
	Kit Roche Diagnostic	Par la chaleur	Kit Roche Diagnostic
	1 ^{ère} culot de centrifugation*	2 ^{ème} culot de centrifugation	3 ^{ème} culot de centrifugation
19	-	+	-
25	-	+	-
Liquide amniotique	Résultat de la PCR en temps réel		

* : culot utilisé lors de la 1^{ère} amplification (série des 30 liquides amniotiques)

Tableau 19 : Résultats de la comparaison des 2 procédés d'extraction : analyse de 2 liquides amniotiques.

Seule l'analyse des échantillons **extraits par le procédé utilisant la chaleur sont positifs**.

Reischl, dans sa dernière étude, utilise le même kit Roche comme moyen d'extraction de l'ADN toxoplasmique (Reischl et al, 2003). Il ne rapporte pas de problèmes éventuellement rencontrés au cours de cette étape. Cependant, par rapport à notre seconde méthode, l'extraction de l'ADN toxoplasmique par le kit Roche présente les inconvénients d'être plus longue et plus coûteuse. En effet, il y a 6 étapes de centrifugation, la technique est très consommatrice de réactifs et de matériel. Le temps nécessaire à l'extraction d'un seul liquide amniotique est d'environ 30 minutes contre 10 avec la seconde méthode.

Pour ces raisons et d'après les résultats obtenus **nous choisissons ce procédé d'extraction par la chaleur**.

Au total sur 11 liquides amniotiques qui ont donné des résultats discordants par rapport à la PCR-DEIA, 5 sont probablement des faux positifs, 5 liquides amniotiques ont donné des résultats positifs après changement du procédé d'extraction, 1 seul est toujours resté négatif.

1.2.3.2 – Introduction d'un contrôle positif interne

Au regard des résultats et pour s'affranchir de la présence d'un éventuel inhibiteur, la réaction de PCR nécessite un contrôle interne. Le mélange utilisé est fourni par Applied Biosystems contenant l'**IPC Mix 10X** (amorces et sonde TaqMan) et l'**IPC DNA 50X** (cible). Le kit contient un contrôle positif interne **pré-optimisé**, qui 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 comportant la Taq polymérase. La sonde utilisée pour le contrôle positif interne est également une sonde fluorogénique. Mais le fluorophore rapporteur est différent de celui fixé sur la sonde qui s'hybride au fragment cible du gène B1. Par conséquent, les deux signaux de fluorescence sont bien distincts. Pour un liquide amniotique positif et en l'absence d'inhibiteur de la réaction de PCR, on obtient deux courbes sigmoïdes d'amplification. L'une des courbes correspond à l'échantillon et l'autre au contrôle positif interne, visualisée grâce à la sélection d'un second canal de mesure (réseau de fibres optiques).

Pour chaque amplification, nous utilisons 5 échantillons :

- un témoin négatif de réaction (eau distillée),
- trois dilutions d'un liquide amniotique positif : dilution au 20^{ème}, 40^{ème} et 80^{ème},
- un liquide amniotique négatif.

Un volume de 3µl d'IPC (Mix et ADN) est ajouté dans chaque tube contenant les échantillons à analyser. La température d'hybridation et d'élongation de 65°C est trop élevée puisque les Ct des contrôles positifs internes de chaque échantillon testé

sortent aux environs de 40 cycles. Trois autres températures sont alors testées : 62°C, 63°C et 64°C (1^{ère} partie du **Tableau 20**). En se basant notamment sur le témoin négatif de réaction, les Ct sont respectivement de 25.27, 29.39 et 38.06 cycles. La température de 62°C semble être la plus adaptée. Parallèlement, nous avons testé aux différentes températures choisies un liquide amniotique positif correspondant à l'échantillon 26 (annexe VII). A la température de 62°C le Ct est de 44.3 cycles, l'échantillon positif sort tardivement. Le **meilleur compromis** semble être obtenu à la température de **63°C** où le Ct de l'échantillon 26 (31.4) est peu différent du Ct moyen (31.7) obtenu à 65°C (2^{ème} partie du **Tableau 20**).

Ct du contrôle interne positif (en nombre de cycles)				
Température (en °C)	65	64	63	62
Témoin négatif	40.01	38.06	29.39	25.27
LAP au 20^{ème}	43.64	38.72	30.83	44.73
LAP au 40^{ème}	38.07	37.62	29.76	26.18
LAP au 80^{ème}	39.39	35.65	29.09	26.23
LAN	39.4	43.13	29.6	27.79

Ct du liquide amniotique N°26 (en nombre de cycles)				
Température (en °C)	65	64	63	62
1^{ère} amplification	31.68	32.7	31.4	44.3
2^{ème} amplification	34.4			
3^{ème} amplification	33.2			
4^{ème} amplification	30.2			
5^{ème} amplification	29			
Moyenne des Ct	31.7			

LAP : liquide amniotique positif
 LAN : liquide amniotique négatif

Tableau 20. Résultats de la mise au point du contrôle interne positif.

La température d'hybridation et d'élongation est ramenée à 63°C.

I.2.4 – Efficacité de la PCR en temps réel

Au niveau expérimental, la quantité de produit formé dépend d'un facteur primordial qui est l'efficacité d'amplification (E). Elle est définie comme étant la proportion moyenne de molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. L'efficacité d'amplification est comprise entre 0 (aucune amplification ne s'est produite) et 1 (après chaque cycle, chaque molécule d'ADN cible a généré deux amplicons). Dans les conditions expérimentales habituelles, E est inférieure à 1 et varie entre 0.78 et 0.97 selon le gène amplifié (Köhler, 1992). De nombreux facteurs peuvent affecter l'efficacité d'amplification : la concentration en désoxyribonucléotide triphosphate, en MgCl₂ et en ADN polymérase, la température, la structure secondaire et le contenu en bases G / C de la séquence cible, la longueur du fragment à amplifier et la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase.

Nous avons déterminé ce facteur pour notre PCR en temps réel à partir des résultats obtenus avec les 7 solutions (*cf* Tableau 14) testées à 63°C pour une concentration en MgCl₂ de 3 mM.

L'efficacité de la PCR est de **0.92** avec un coefficient de corrélation (R) égal à 0.93 (**Annexe IX**).

I.2.5 – Sensibilité de la PCR en temps réel sur des dilutions de toxoplasmes en eau physiologique.

La réactivation des toxoplasmes a nécessité plusieurs repiquages et a duré 1 mois environ. Après comptage au microscope optique en cellule de Malassez, nous avons estimé la concentration à 90.000 toxoplasmes/μl. Afin de déterminer la sensibilité de notre PCR en temps réel, nous avons réalisé 11 dilutions successives de la solution de toxoplasmes dans de l'eau physiologique. Les dilutions correspondant à **10, 5, 1, 0.1, et 0.05 toxoplasmes** sont sélectionnées et traitées comme s'il s'agissait de liquides amniotiques (**Annexe X**).

Afin d'étudier la **sensibilité** et la **reproductibilité** de notre technique, nous avons réalisé 4 PCR dans les mêmes conditions, en utilisant la même gamme de suspensions de toxoplasmes (**Figure 9**). Cette démarche correspond à celle adoptée par Lin (Lin et al, 2000).

	Nombre de toxoplasmes (T)				
	10	5	1	0.1	0.05
Ct obtenus pour la 1 ^{ère} PCR	36	36.5	37.1	36.2	47.4
Ct obtenus pour la 2 ^{ème} PCR	37.6	38.5	41.3	41.6	négatif
Ct obtenus pour la 3 ^{ème} PCR	32.8	34.2	34.3	33.8	négatif
Ct obtenus pour la 4 ^{ème} PCR	35.3	36.4	36.3	39.9	négatif

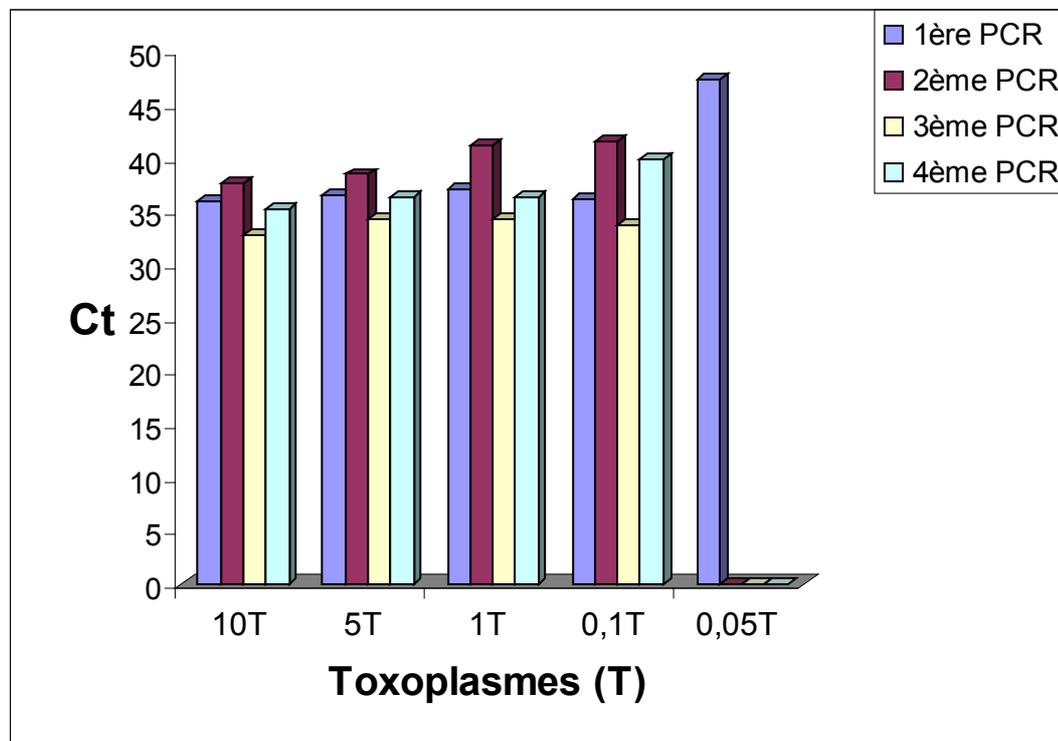


Figure 9. Sensibilité et reproductibilité de la PCR en temps réel : représentation graphique des résultats.

Les variations observées pour une même solution soumise à 4 amplifications différentes peuvent s'expliquer par la présence d'un inhibiteur de la réaction de PCR. En comparant les différentes courbes sigmoïdes relatives au contrôle positif interne, l'inhibition est plus ou moins marquée selon l'amplification. Elle n'est que faiblement prononcée, aléatoire et peut s'expliquer par la qualité de l'ascite de souris (présence de sang dans la solution à 90.000 toxoplasmes/ μ l).

La même gamme de suspensions de toxoplasmes est analysée 1 fois avec la PCR-DEIA. **Tous les résultats sont positifs excepté celui correspondant à la suspension équivalent à 0.05 toxoplasme (Tableau 21).** La densité optique pour cet échantillon est de 0.029 pour un seuil à 0.18 (témoin négatif (0.027) + 0.15).

	Témoin		Nombre de toxoplasmes (T)				
	Positif	Négatif	10	5	1	0.1	0.05
DO*	>3**	0.027	>3	>3	>3	>3	0.029

* : densité optique mesurée à 450 nm

** : densité optique élevée (overflow), supérieure à la limite de détection de la méthode

Tableau 21. Gamme de suspensions de toxoplasmes : résultats obtenus avec la PCR-DEIA.

La sensibilité de notre PCR est supérieure à une quantité d'ADN correspondant à un parasite. Un résultat identique est retrouvé avec la PCR-DEIA.

La **répétabilité** de notre technique est déterminée en utilisant les suspensions correspondant à 10 et 5 toxoplasmes.

- 1^{ère} expérimentation : Tableau 22.

La suspension équivalente à **10 toxoplasmes** est testée 4 fois au sein d'une même série.

Position de l'échantillon	Ct de l'échantillon (en nombre de cycles)
1	33.67
2	33.9
3	34.86
4	36.76

Tableau 22. Répétabilité de la PCR en temps réel : résultats obtenus avec 10 toxoplasmes.

Afin de mesurer la dispersion de cet échantillon autour de sa moyenne, la variance, l'écart-type et le **coefficient de variation** sont calculés :

$$\begin{aligned} - m (\text{moyenne}) &= (33.67+33.9+34.86+36.76)/4 \\ &= 34.8 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - S^2 (\text{variance}) &= 1/4 ((33.-34.8)^2 + (33.9-34.8)^2 + (34.86-34.8)^2 + (36.76- \\ &34.8)^2) \\ &= 1.4830 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \sigma (\text{écart-type}) &= \text{racine carrée de la variance} = S \\ &= 1.2178 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - CV (\text{coefficient de variation}) &= \sigma / m \\ &= \mathbf{3.5 \%} \end{aligned}$$

La moyenne des Ct est de 34.8 cycles avec un **coefficient de variation** relativement bas égal à **3.5 %**.

- 2^{ème} expérimentation : Tableau 23.

La suspension équivalente à **5 toxoplasmes** est testée 4 fois au sein d'une même série.

Position de l'échantillon	Ct de l'échantillon (en nombre de cycles)
1	39.33
2	39.84
3	38.43
4	38.41

Tableau 23. Répétabilité de la PCR en temps réel : résultats obtenus avec 5 toxoplasmes.

$$m \text{ (moyenne)} = (39.33+39.84+38.43+38.41)/4 \\ = 39$$

$$- S^2 \text{ (variance)} = 1/4 ((39.33-39)^2 + (39.84-39)^2 + (38.43-39)^2 + (38.41-39)^2) \\ = 0.3718$$

$$- \sigma \text{ (écart-type)} = S \\ = 0.6098$$

$$- CV \text{ (coefficient de variation)} = \sigma/m \\ = 1.5 \%$$

Pour cette série, la moyenne des Ct est de 39 cycles avec **un coefficient de variation égale à 1.5 %**.

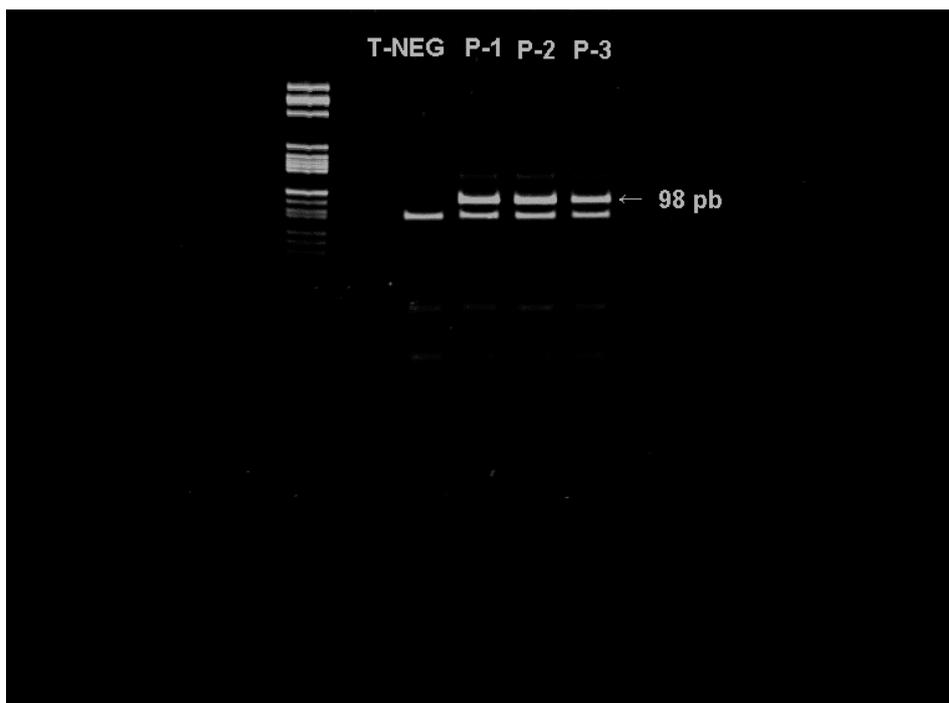
Notre PCR en temps réel est tout à fait reproductible et répétable.

I.2.6 – Spécificité de la PCR en temps réel

Après la réalisation du test de PCR en temps réel, la taille des fragments amplifiés est vérifiée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide additionné de bromure d'éthidium.

- 1^{ère} expérimentation : migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide à 9 % (Figure 10).

Le gel de polyacrylamide à 9% (**Annexe XI**) est habituellement utilisé au laboratoire de parasitologie. Après le dépôt de chaque solution d'amplicons (10µl + 2µl de tampon de charge) dans les puits, le gel est soumis à une électrophorèse pendant 60 minutes à 120 Volts. Les fragments amplifiés sont ensuite visualisés sous une lumière ultraviolette après un bain de bromure d'éthidium.



La piste la plus à gauche correspond au **marqueur de taille V**
 T-NEG : **Témoin négatif** de réaction
 P-1 : Suspension à **10 toxoplasmes**
 P-2 : **Liquide amniotique 26** de Mme X... : **positif**
 P-3 : **Liquide amniotique 17** de Mme Y... : **positif**

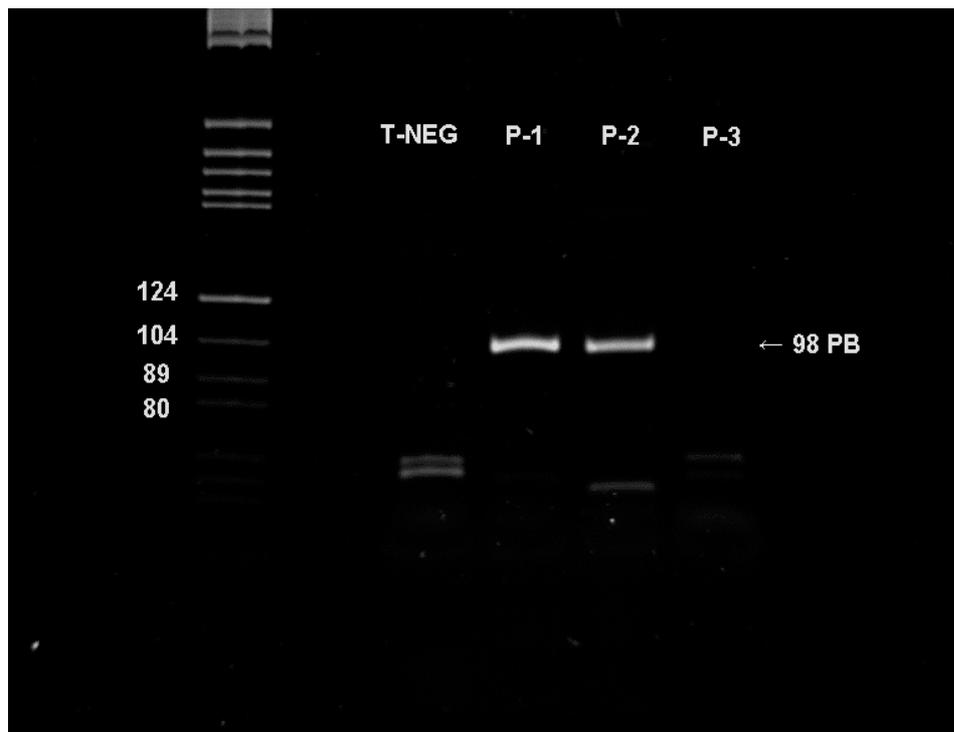
Figure 10. Spécificité de la PCR en temps réel dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose (gel de polyacrylamide à 9%).

La spécificité de l'amplification de l'ADN toxoplasmique est vérifiée par l'apparition d'une **bande unique de 98 paires de bases**.

Les bandes situées en bas du gel correspondent au front de migration où sont présents notamment les dimères d'amorces. Le témoin négatif ne présente pas de bande à 98 paires de bases mais une bande unique de plus petite taille (entre 80 et 89 pb) qui correspond aux fragments d'ADN du contrôle interne positif (IPC) amplifié simultanément au cours de la réaction. On retrouve cette bande pour les échantillons P-1, P-2 et P-3, témoin de l'absence d'inhibition de la PCR au cours de l'expérimentation.

- 2^{ème} expérimentation : migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide à 6 % (Figure 11).

Afin d'améliorer la séparation des bandes entre 100 et 80 pb, nous avons augmenté le temps de migration électrophorétique d'une demie heure et la composition du gel pour qu'il soit plus discriminant. Avec une composition à 6 % d'acrylamide-bisacrylamide, le réseau de mailles est plus fin. Plusieurs expérimentations ont été nécessaires avant d'obtenir une image satisfaisante.



La piste la plus à gauche correspond au **marqueur de taille V**
T-NEG : **Témoin négatif** de réaction
P-1 : Suspension à **10 toxoplasmes**
P-2 : **Liquide amniotique 26** de Mme X... : **positif**
P-3 : **Liquide amniotique 64** de Mme Z... : **négatif**

Figure 11. Spécificité de la PCR en temps réel dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose (gel de polyacrylamide à 6%).

Dans cette 2^{ème} expérimentation, l'amplification s'est déroulée sans la présence du contrôle interne positif afin de visualiser uniquement les amplicons correspondant à l'ADN toxoplasmique. Les pistes correspondant au témoin négatif et au liquide amniotique négatif (P-3) ne montrent aucune bande visible sur le gel, à l'inverse des pistes P-1 et P-2 qui objectivent de façon nette une bande unique de 98 pb.

A un liquide amniotique positif correspond une bande unique de 98 pb, visible de façon nette sur le gel. Notre PCR en temps réel est spécifique.

I.2.7 – Application de la PCR en temps réel aux liquides amniotiques selon le protocole définitif.

Par rapport à notre première application aux liquides amniotiques, un paramètre est modifié : la température d'hybridation et d'élongation désormais **fixée à 63°C**. Pour chaque amplification nous avons **introduit le contrôle positif interne**.

En appliquant **le protocole opératoire définitif** disponible en **annexe XII** nous avons testé **41 nouveaux** liquides amniotiques, **25** liquides amniotiques étiquetés **positifs** et **16** liquides amniotiques étiquetés **négatifs**. Ces 41 échantillons sont sélectionnés en fonction des résultats obtenus avec :

- la simple PCR qui est la technique utilisée au laboratoire avant 1999,
- la PCR-DEIA,
- l'inoculation à la souris,
- les cultures cellulaires.

L'ensemble des résultats obtenus avec ces différentes techniques est joint en **annexe XIII**.

Au cours des 41 amplifications, nous n'avons jamais eu de problème de contamination : les Ct des témoins négatifs de réaction sont toujours restés nuls. De même aucun inhibiteur de la réaction de PCR n'a été mis en évidence.

Les **tableaux 24 et 25** regroupent les résultats obtenus avec la PCR en temps réel comparativement aux deux autres techniques de PCR.

	PCR en temps réel	Simple PCR
Liquides amniotiques positifs	23	24
Liquides amniotiques négatifs	7	6
Total	30	

Tableau 24. Comparaison des résultats obtenus avec la PCR en temps réel versus simple PCR.

Par rapport à la simple PCR, notre technique a objectivé **1 résultat discordant**. Il correspond au liquide amniotique **55** pour lequel l'inoculation à la souris et les cultures cellulaires sont négatives. Il est analysé à deux reprises avec notre PCR en temps réel et une fois en parallèle avec la PCR-DEIA. Seule la simple PCR est positive, mais à l'origine le prélèvement analysé était très sanglant. De plus, nous avons constaté que ce liquide amniotique **55** correspond à un jumeau droit. Le liquide amniotique 56 est associé au jumeau gauche pour lequel le diagnostic anténatal par simple PCR est négatif. Le manque d'information notamment sur le suivi de l'enfant ne nous a pas permis de conclure de façon définitive.

	PCR en temps réel	PCR-DEIA
Liquides amniotiques positifs	1	1
Liquides amniotiques négatifs	10	10
Total	11	

Tableau 25. Comparaison des résultats obtenus avec la PCR en temps réel versus PCR-DEIA.

En ce qui concerne les résultats de la PCR en temps réel et de la PCR-DEIA, **nous n'avons pas obtenu de discordance**. Les prélèvements analysés sont tous des liquides amniotiques de l'année 2003. Ils n'ont pas été congelés et ont été testés en parallèle avec les deux techniques.

Dans une deuxième étape, nous avons à nouveau testé, selon le protocole opératoire définitif, et en parallèle avec la PCR-DEIA, les 6 liquides amniotiques **1, 2, 11, 12, 13, 14** pour lesquels les résultats sont apparus discordants lors de la première application de notre PCR.

Les résultats de l'analyse réalisée en 2003 sur les liquides amniotiques **1, 11, 12, 13, 14** par la PCR en temps réel et par la PCR-DEIA sont tous négatifs (**Tableau 26**). Ce constat permet de confirmer l'hypothèse émise précédemment, à savoir qu'il s'agit probablement de liquides amniotiques répondus faussement positifs. Cependant, il faut garder à l'esprit qu'une mauvaise conservation de l'ADN est possible. Dans ce cas, la sensibilité est nettement diminuée, d'autant plus qu'au départ le liquide amniotique est très faiblement parasité. Là encore, il est difficile d'affirmer un tel résultat en l'absence du suivi néonatal et du suivi de l'enfant. Deux cas de figure sont possibles :

- 1) après l'accouchement, si la présence d'arguments parasitologiques et sérologiques confirme l'atteinte fœtale, la perte de sensibilité de la PCR est liée à une dégradation de l'ADN toxoplasmique au cours du temps,
- 2) l'absence d'argument formel en faveur d'une toxoplasmose congénitale, incluant le suivi de l'enfant jusqu'à un an, va permettre d'affirmer que le liquide amniotique concerné est en réalité négatif.

La recherche de l'ADN toxoplasmique dans le liquide amniotique **2** s'est avérée positive avec la PCR-DEIA et de nouveau négative avec notre PCR. Nous n'avons pas mis en évidence d'inhibiteur de la réaction de PCR.

Nous avons eu beaucoup de difficultés à collecter les données concernant les patientes, les nouveaux-nés et les enfants (problème d'accès à l'archivage informatique, difficultés d'accès aux dossiers manuscrits, suivi de l'enfant réalisé en dehors de l'hôpital de Nantes). Au total, nous avons récupéré les résultats de l'examen du placenta et du sang de cordon. Pour seulement deux enfants, le suivi sérologique a été réalisé dans le laboratoire de parasitologie de Nantes (**Tableau 26**). Ils correspondent aux liquides amniotiques **11 et 12** ponctionnés en 1999. L'ensemble du bilan biologique à la naissance est négatif, la surveillance sérologique des enfants tous les mois puis tous les deux mois a montré une diminution du titre des IgG et l'absence de synthèse d'IgM et d'IgA spécifiques. A **un an**, les sérologies sont **totale-ment négatives** pour les deux enfants permettant d'écarter définitivement le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

Les liquides amniotiques **11 et 12** sont **avec certitude des faux positifs**.

Le diagnostic néonatal est considéré comme positif lorsque l'inoculation à la souris du placenta et / ou du sang de cordon est positive. Nous n'avons pas retrouvé de tels résultats pour les autres liquides amniotiques (**1, 2, 13, 14, 55**). Ce sont les seuls résultats dont nous disposons. Pour ces 5 liquides amniotiques nous pouvons fortement suspecter un résultat faussement positif mais sans pouvoir le prouver.

Au total sur 47 amplifications, nous avons mis en évidence 7 résultats discordants. Pour deux d'entre eux, nous avons conclu à une réponse faussement positive.

LA	Culture cellulaire	Inoculation à la souris	PCR-DEIA (1999-2000)		PCR-DEIA (2003)		PCR en temps réel	Inoculation du placenta à la souris		Inoculation du sang de cordon à la souris		Sérologique de J10 à 12 mois, IgM et IgA	Sérologie à 1 an de vie
			DOe / DOs		DOe / DOs			Sérologie à 3 S	Sérologie à 6 S	Sérologie 3 S	Sérologie 6 S		
1	NEG	NEG	0.55 / 0.18	+	0.054 / 0.15	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
2	NEG	NEG	>3	+	2.35 / 0.22	+	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
11	NEG	NEG	0.23 / 0.21	+	0.056 / 0.15	-	-	-	-	-	-	-, ↓ des IgG	-
12	NEG	NEG	0.19 / 0.17	+	0.042 / 0.15	-	-	-	-	-	-	-, ↓ des IgG	-
13	NEG	NEG	0.9 / 0.17	+	0.063 / 0.17	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
14	NR	NEG	0.20 / 0.16	+	0.051 / 0.18	-	-	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue
55	NEG	NEG	+ (simple PCR 1997)		0.025 / 0.22	-	-	-	-	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue

LA : liquide amniotique

NEG, - : résultat négatif

+ : résultat positif

NR : technique non réalisée

↓ : diminution

DOe : densité optique de l'échantillon analysé

DOs : densité optique seuil

>3 : densité optique élevée (overflow), supérieure à la limite de détection de la méthode

S : semaines

Tableau 26. Récapitulatif des résultats des 7 liquides amniotiques posant un problème. Diagnostic néonatal et suivi des enfants.

II – DISCUSSION ET CONCLUSION

La sensibilité de notre PCR en temps réel, déterminée au moyen d'une gamme de suspensions de toxoplasmes en eau physiologique **est supérieure à 1 toxoplasme**. L'obtention d'une telle gamme est le procédé couramment utilisé afin d'étudier la sensibilité d'une technique de PCR appliquée à la détection de l'ADN toxoplasmique. Pour chaque dilution utilisée, il ne s'agit que d'une quantité théorique de toxoplasmes. Par ce procédé, il est impossible d'évaluer avec précision la concentration finale de chaque solution puisque les risques d'erreurs sont nombreux. Le nombre de toxoplasmes par microlitre est évalué après comptage au microscope optique et le rendement d'extraction n'est pas rigoureusement identique d'un échantillon à l'autre. Ceci dit, il est nécessaire de réaliser les dilutions successives au préalable avant d'extraire chaque solution puis de les traiter dans les mêmes conditions dans le but d'être le plus juste possible. L'imprécision dans la quantification des toxoplasmes est inévitable aux fortes dilutions. En effet, une erreur est possible lors du prélèvement des volumes d'échantillon (pipettage). De plus, les toxoplasmes peuvent former des agrégats entre eux ou se fixer à la paroi des tubes servant à réaliser les dilutions.

Notre étude a permis de comparer la sensibilité de notre PCR en temps réel par rapport à la PCR-DEIA, actuellement utilisée au laboratoire. **Le seuil de détection** de l'ADN toxoplasmique **est équivalent** dans les deux techniques. Ce résultat est important puisqu'il conditionne la validité de notre PCR. Une perte de sensibilité est peu compatible avec une utilisation en routine de la technique. Malgré une prise en charge très rigoureuse de la toxoplasmose congénitale, une réponse faussement négative n'est pas sans conséquence sur une éventuelle atteinte du fœtus.

Le résultat de notre sensibilité est identique à celui retrouvé dans l'étude de Lin et ses collaborateurs qui nous a servi de base pour la mise au point de notre PCR. Il utilise comme cible le gène B1, la technologie TaqMan, les amorces et la sonde que nous avons décrites (**Tableau 27**). La diversité des techniques de PCR utilisées pour la recherche de l'ADN toxoplasmique est soulignée dans ce tableau. Toutes les PCR pour un micro-organisme et pour une technique de biologie moléculaire donnée n'ont pas les mêmes performances en terme de sensibilité et de spécificité. Le choix du gène à amplifier mais également le choix des amorces apparaissent fondamentaux.

La comparaison des seuils de détection de l'ADN toxoplasmique purifié, après amplification des trois cibles P30, B1, TGR1E a permis de démontrer que le seuil est d'autant plus faible que la cible est répétée : le seuil de TGR1 est 10 fois plus faible que celui de B1, lui-même 100 fois plus faible que celui de P30 (Paugam, 1999). Plusieurs équipes ont étudié les performances de PCR basées sur le gène B1 (primers 5 et 6) et TGR1E sur sang de patients sidéens (Zylberberg et al, 1995 ; Robert-Gangneux et al, 1996) : l'amplification d'une séquence du gène TGR1E apparaît plus sensible, mais moins spécifique. Parmi les amorces spécifiques du gène B1 utilisées, Verhofstede (Verhofstede et al, 1993) a estimé la sensibilité et la spécificité des amorces 1 et 4 (Burg et al, 1989) moins bonnes que celles des amorces B22 et B23 (Bretagne et al, 1993).

Auteurs et année de publication	Technique de biologie moléculaire utilisée	Révélation	Gène amplifié	Sensibilité estimée	Méthode pour évaluer la sensibilité
Burg et al, 1989	PCR	Dot- Blot avec hybridation à l'aide d'une sonde « chaude »	Gène B1	1 toxoplasmes	Gamme de suspensions de toxoplasmes
Grover et al, 1990	PCR	Dot- Blot avec hybridation à l'aide d'une sonde « chaude »	Gène B1	1-10 toxoplasmes	Gamme de suspensions de toxoplasmes
Jenum et al, 1998	«nested»-PCR	Migration sur gel d'agarose avec révélation au B.E.T.	Gène B1	1-10 toxoplasmes	Gamme de suspensions de toxoplasmes
Robert-Gangneux et al, 1999	PCR multiplex	Sonde d'hybridation	Gène B1 Séquence TGR1E	1-10 toxoplasmes	Non précisé
Lin et al, 2000	PCR en Temps réel	TaqMan	Gène B1	< 1 toxoplasme	Gamme de suspensions de toxoplasmes
Lin et al, 2000	«nested»-PCR	Migration sur gel d'agarose avec révélation au B.E.T.	Gène B1	< 1 toxoplasme	A partir des résultats obtenus pour la PCR en Temps réel
Nantes 2003	PCR en Temps réel	TaqMan	Gène B1	< 1 toxoplasme	Gamme de suspensions de toxoplasmes
Nantes	PCR-DEIA	Sonde d'hybridation et mesure d'une densité optique	Gène B1	< 1 toxoplasme	A partir des résultats obtenus pour la PCR en Temps réel

Tableau 27. Comparaisons des sensibilités obtenues avec différentes techniques de PCR amplifiant le gène B1.

La diversité des techniques de PCR utilisées pour la recherche de l'ADN toxoplasmique contraste avec la rareté des études comparatives. Cette tendance semble s'inverser avec l'apparition de la PCR en temps réel. Plusieurs travaux ont été réalisés afin de comparer le seuil de détection de l'ADN toxoplasmique après amplification en temps réel de différentes cibles. Buchbinder s'est intéressé au gène B1 et au gène P30 (Buchbinder et al, 2003). Pour déterminer la détection limite de ces cibles, une gamme comprise entre 100.000 et 1 toxoplasme est testée par PCR en temps réel (technologie LightCycler). La prise d'essai est de 2µl et l'expérimentation est renouvelée 5 fois. Pour la concentration la plus basse (1 toxoplasme par ml), le Ct moyen est de 33.5 +/- 1.5 (gène B1) contre 35 +/- 1.5 (gène P30). Pour la concentration la plus élevée (100.000 toxoplasmes par ml), les Ct moyens sont respectivement de 15.5 +/- 0.6 et 21.2 +/- 0.8. Le gène B1 étant répété 35 fois, les Ct apparaissent plus tôt. Cette étude souligne également le fait qu'au dessous de 10 toxoplasmes la PCR est sensible mais difficilement reproductible.

Homan a identifié un nouveau gène, répété 200 à 300 fois sur l'ADN toxoplasmique. Il s'agit d'**une séquence de 529 pb** dont le seuil de détection serait encore plus faible que celui du gène B1. Dans son étude, la séquence est retrouvée chez 60 souches de toxoplasmes testés. Elle est spécifique de *Toxoplasma gondii* (pas de réaction croisée avec les autres parasites) (Homan et al, 2003). Dans une autre étude récente, Reischl compare la sensibilité respective du gène B1 et de ce nouveau gène cryptique par PCR en temps réel LightCycler hybridation (Reischl et al, 2003). Au bout de 35 cycles, la détection limite utilisant la cible B1 est de 200 femtogramme d'ADN toxoplasmique contre 20 pour la nouvelle cible. La sensibilité de la séquence 529 paires de bases semble nettement supérieure. A l'intérieur du gène, un fragment de 404 paires de bases a été séquencé et est disponible sous la dénomination AF487550 dans la banque génomique. L'utilisation de cette cible semble prometteuse et constitue une nouvelle avancée dans le domaine du diagnostic anténatal de la toxoplasmose par PCR. Néanmoins, d'autres travaux doivent être entrepris afin de confirmer ce gain de sensibilité.

Pour un liquide amniotique positif, **un amplicon unique de 98 paires de bases** est visible de façon nette sur le gel. La technique de PCR en temps réel telle que nous l'avons testée au laboratoire avec une sonde d'hybridation (TaqMan) s'avère très spécifique. Dans des conditions optimales, elle permet de détecter et de quantifier **exclusivement le gène cible**.

Dans notre travail, nous avons testé avec la PCR en temps réel **71** liquides amniotiques différents **dont 41 dans les conditions opératoires définitives**, identiques à celles utilisées afin de déterminer la sensibilité.

L'application de notre PCR en temps réel sur les liquides amniotiques nous a conduit à des résultats discordants et a permis de souligner les difficultés rencontrées pour obtenir la totalité des renseignements concernant un enfant, dont la mère a fait une séroconversion pergestationnelle. A partir du moment où la séroconversion toxoplasmique est confirmée chez une femme enceinte, un grand nombre d'exams biologiques est réalisé allant du diagnostic anténatal jusqu'au suivi de l'enfant pendant au moins un an. Dans la période prénatale et néonatale, les techniques pratiquées sont réalisées dans des laboratoires spécialisés le plus souvent à l'hôpital. Les données correspondantes sont alors centralisées et facilement consultables.

Au contraire le suivi sérologique de l'enfant peut être assuré dans n'importe quel laboratoire. C'est le cas le plus fréquent. A l'issue de nos recherches, seulement deux suivis post-natals sur 7 nécessaires ont été réalisés au laboratoire de parasitologie de Nantes. La difficulté des études rétrospectives dans le domaine de la toxoplasmose congénitale est un fait, d'autant plus que le diagnostic s'étend sur une longue période.

Les résultats de l'inoculation à l'animal ont montré seulement 8 réponses négatives pour l'ensemble des liquides amniotiques retrouvés **positifs sans ambiguïté** avec les techniques de biologie moléculaire. Les cultures cellulaires ont montré 13 résultats négatifs. Dans un cas, cette technique est positive et l'inoculation à l'animal négative. La difficulté d'obtenir un bon tapis cellulaire et la difficulté de lecture expliquent la moins bonne sensibilité des cultures cellulaires. Cependant, un résultat positif avec l'inoculation à l'animal nécessite une analyse pratiquée dans des conditions techniques rigoureuses : nombre de souris (2), entretien des animaux, prévention des infections bactériennes chez l'animal par injection prophylactique d'antibiotiques, formation du personnel technique. Les différences de **sensibilité** de ces méthodes **en faveur de la PCR** peuvent s'expliquer par l'efficacité de la spiramycine. Des travaux expérimentaux réalisés chez des singes rhésus, femelles gestantes, infectés par *Toxoplasma gondii* ont prouvé le passage transplacentaire de la spiramycine (Schoodermark et al, 1994a ; schoodermark et al, 1994b). A la suite d'un traitement de 12 jours par ce produit, les parasites sont mis en évidence par PCR alors que l'inoculation à la souris est négative. Ces mêmes auteurs ont démontré que la spiramycine réduit la quantité de parasite chez l'hôte infesté et dans le liquide amniotique, pouvant expliquer ces résultats.

Des faux négatifs sont possibles **avec l'inoculation à l'animal** mais également **avec la PCR**. Ils peuvent être liés au délai de transmission placentaire du toxoplasme de la circulation maternelle à la circulation fœtale comme cela a été évoqué par Roman (Roman et al, 2001). Il est donc important de pratiquer l'amniocentèse dans un délai de 3 semaines à 1 mois après la date de séroconversion maternelle. De plus, ces faux négatifs imposent de réaliser un bilan néonatal et un suivi de l'enfant.

L'inoculation à la souris permettrait de détecter quelques faux négatifs en PCR. Dans une étude réalisée par Romand, sur 27 faux-négatifs, 2 sont retrouvés positifs par inoculation à la souris (Romand et al, 2001). Dans notre travail, nous n'avons pas observé de tels cas.

Par ailleurs, nous avons constaté que sur l'ensemble des liquides amniotiques analysés au moyen de la PCR-DEIA, les densités optiques obtenues pour un liquide amniotique positif sont au moins supérieures à 2 (le plus souvent au-delà de la limite de détection de la technique). Par conséquent, l'obtention d'un résultat plus faible ou proche du seuil pour un échantillon donné justifierait de pratiquer une seconde analyse afin de le contrôler.

Nous avons souligné la **rapidité de réalisation** des tests avec la PCR en temps réel. Ce gain de temps n'est pas négligeable. Le résultat d'un liquide amniotique est rendu en moins d'une matinée.

Sa mise au point est relativement simple et rapide. A contrario, les méthodes conventionnelles sont souvent longues et fastidieuses à mettre en place. La technique est simple de réalisation et permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en même temps. Cependant, le coût de la PCR en temps réel reste encore élevé et peut constituer un frein à son utilisation. L'équipement, la maintenance et les réactifs sont chers.

Le **type d'enzyme** utilisée est **important** surtout pour la méthode TaqMan. Des polymérases à activité exonucléasique doivent être utilisées, mais d'après une étude effectuée par l'équipe de Kreuzer, le choix de l'ADN polymérase est primordial. Il teste et compare l'activité exonucléasique de 7 polymérases différentes. Seule l'une d'entre elles présentait une courbe d'amplification sigmoïde comme attendue dans les réactions de cinétique exponentielle. Ainsi, les 7 enzymes présenteraient des activités très différentes avec un rendement très variable (Kreuzer et al, 2000).

Un problème de stockage des échantillons (incubation de plus de 48 heures à température ambiante), les congélations multiples des extraits peuvent diminuer la quantité d'ADN. Il est également possible de rencontrer des problèmes d'inhibition de la réaction de PCR. L'utilisation d'un contrôle interne est importante et nécessaire. Le résultat de l'amplification par PCR d'un échantillon de liquide amniotique peut être faussement négatif si la présence d'un inhibiteur de l'ADN polymérase n'est pas mise en évidence. Notre contrôle positif interne (IPC) s'est avéré efficace. Sur l'ensemble des 41 amplifications les **Ct correspondant à l'IPC sortent relativement tôt** (entre 29 et 30 cycles) avec une courbe d'amplification parfaitement sigmoïde.

L'amplification d'une séquence du gène de la β -globine est un autre procédé permettant de détecter la présence d'inhibiteur. Il est hautement conservé sur le génome humain. L'utilisation de ce gène, dans la PCR en temps réel, est souvent associée à une technologie utilisant les intercalants (*sybr green*). La séquence choisie peut également appartenir au gène de la β -actine.

En toute rigueur, notre PCR en temps réel appliquée en routine aux liquides amniotiques, devra comporter en plus de l'IPC et du témoin négatif, un témoin positif. Il peut correspondre à une ascite de souris contenant une faible quantité de toxoplasmes. Ce témoin positif permettra de s'assurer du bon déroulement de la phase d'hybridation et du programme de température.

La technique est **dépendante de l'extraction du matériel génétique** pour laquelle un grand nombre de techniques peuvent être utilisées : Isoquick (Orca Research), technique traditionnelle utilisant le phénol chloroforme (Manialis et al, 1989), DNA Extraction WB kit (Wako Pure Chemical Industries, Nuclisens extractor (Organon Teeknika), méthode de Boom (Boom et al, 1990). Dans la grande majorité des cas, les techniques d'extraction associées à la PCR en temps réel suivent des protocoles commercialisés par Qiagen ou Roche Diagnostic. Ils présentent l'avantage d'assurer la purification de l'ADN toxoplasmique à l'aide d'une colonne. Cette purification trouve son principal intérêt lorsque l'on réalise une gamme d'étalonnage dans le but d'une quantification de l'ADN. L'équipe de Najjioullah a comparé l'efficacité de la technique TaqMan sur 30 échantillons de sang dont l'ADN avait été extrait par deux techniques différentes : l'une commercialisée par Qiagen (QIAamp Blood Kit) et l'autre par Roche Diagnostic (High Pure Viral Nucleic Acid Kit).

Des discordances ont été observées sur 12 d'entre eux (Najioullah et al, 2001). A la suite de ce constat, Bretagne propose l'automatisation de l'extraction des acides nucléiques. Il souligne également la nécessité d'une standardisation des techniques de PCR avec la mise sur le marché de kits commercialisés (Bretagne, 2003).

Actuellement, il n'y a **pas de standardisation** des méthodes de biologie moléculaire appliquée au diagnostic anténatal de la toxoplasmose sur liquide amniotique. Chaque laboratoire adopte une technique et un protocole opératoire différents. Néanmoins, il semble très probable qu'un consensus s'établisse pour la PCR en temps réel dans les années à venir (Costa et al, 2000 ; Costa et al, 2001 ; Kupferschmidt et al, 2001). L'absence de standardisation des protocoles a justifié récemment une étude européenne de contrôle de qualité (Pelloux et al, 1998). Quinze laboratoires ont volontairement participé à l'étude, chaque laboratoire devant tester en aveugle 12 échantillons de liquide amniotique. Huit échantillons étaient positifs (réalisés en mélangeant au liquide amniotique des toxoplasmes de culture afin d'obtenir une gamme de suspensions en duplicates de 1, 10, 100, 1000 toxoplasmes par ml) et quatre échantillons étaient négatifs. Chaque laboratoire utilisait son propre protocole d'extraction, d'amplification et de révélation des produits de PCR. La plupart des laboratoires amplifiaient la cible B1 (11/15) et révélaient les produits de PCR après migration sur gel et coloration par le bromure d'éthidium (14/15). Pour l'ensemble des laboratoires, selon la concentration de la suspension de toxoplasmes, le pourcentage de positivité des tests était de 40 % pour une concentration de 1 toxoplasme par ml, de 60 % pour une concentration de 10 toxoplasmes par ml, de 86% pour une concentration de 100 toxoplasmes par ml, de 80 % pour une concentration de 1000 toxoplasmes par ml. Pour les échantillons négatifs (4 par laboratoire), 3 laboratoires sur 15 ont rendu une fausse positivité et 1 laboratoire a rendu les 4 liquides amniotiques positifs. Les résultats de cette étude montrent la nécessité de la mise en place d'un contrôle de qualité externe aux laboratoires, posent le problème de l'absence de standardisation des techniques de biologie moléculaire utilisées à visée diagnostique, et soulignent le problème majeur de la PCR à visée diagnostique : la **fausse positivité due à une contamination**.

Le principal risque de contamination est lié aux amplicons (aérosol) générés lors d'une PCR précédente positive. Ils peuvent contaminer un tube ne contenant pas d'ADN cible et être responsable d'une fausse positivité. Pour limiter ce risque les locaux destinés aux techniques de biologie moléculaire sont organisés de façon particulière avec notamment des unités pré et post-PCR. Avec la PCR en temps réel, **l'absence de manipulation des produits amplifiés** limite d'autant mieux ce risque. Mais il existe d'autres sources potentiellement contaminatrices liées :

- 1) à l'ADN toxoplasmique issu d'un autre échantillon biologique traité dans la même série (contamination inter-échantillon),
- 2) à l'ADN de toxoplasmes « exogènes » c'est-à-dire issu de l'environnement proche (toxoplasmes cultivés sur cellules fibroblastiques ou entretenus par inoculation à la souris),
- 3) aux produits de clonage.

Pour limiter au maximum le risque de contamination, différentes techniques d'inactivation des amplicons sont actuellement disponibles, parmi lesquelles le système **dUTP/UNG** (Longo et al, 1990). Le principe de ce système de décontamination est de générer des amplicons différents de l'ADN cible. On amplifie en utilisant du dUTP (déoxy-uridine triphosphate) à la place du dTTP (déoxy-thymidine triphosphate). Les amplicons générés sont alors sensibles à l'inactivation par l'UNG (uracile N glycosylase). Elle procède à un véritable « nettoyage » en amont de l'amplification. Ainsi, l'action de cette enzyme, suivie de sa destruction avant chaque PCR, permet de détruire des amplicons qui auraient pu contaminer les échantillons à tester.

Au cours d'une réaction de PCR en temps réel, l'utilisation de l'UNG est possible. Pour cela on ajoute au programme d'amplification un 3^{ème} cycle de température permettant l'activation de l'UNG (2 minutes à 50°C). L'inactivation de l'enzyme est assurée au cours du second cycle de température (95°C) en même temps que la dénaturation de l'ADN et l'activation de la Taq polymérase. Pour des raisons liées au coût élevé de l'enzyme, nous n'avons pas adopté ce procédé au cours de la mise au point de la PCR.

La PCR en temps réel offre de nouvelles perspectives :

Les premières approches de quantification des gènes ont fait appel à l'utilisation d'une solution titrée d'acide nucléique servant à l'élaboration d'une gamme d'étalonnage. Le résultat de l'analyse donne une évaluation de la quantité relative de matrice cible par rapport au standard. La précision des résultats obtenus est très souvent limitée du fait de la grande variabilité d'efficacité d'une PCR à l'autre. L'introduction d'un standard interne coamplifié a permis de corriger en partie la variabilité d'un tube à l'autre et a conduit au développement de différentes méthodologies de quantification.

Le nombre élevé de stratégies de quantification proposées reflète bien la difficulté d'obtenir des résultats fiables et reproductibles. L'introduction d'une molécule « reporter » fluorescente dans le milieu réactionnel et la détection des produits de PCR par une méthode fluorimétrique ont conduit au développement récent des techniques de PCR quantitative en temps réel. Ces dernières colligent les données d'amplification au point de départ de la phase exponentielle de la réaction, contrairement à la PCR classique qui collecte les données en fin de réaction au niveau de la phase de saturation. A ce stade, certains des composés de la réaction peuvent être limitants. La PCR en temps réel permet par conséquent une **quantification** beaucoup **plus fiable** et **plus sensible** que les techniques en point final (Sambrook et al, 2001).

La détermination d'une quantité d'ADN toxoplasmique dans un échantillon repose sur l'établissement d'une gamme de suspensions de toxoplasmes. Une ascite, obtenue après inoculation de la souche RH à la souris, est lavée par du PBS (phosphate-buffered saline). Après comptage au microscope optique, des dilutions successives de l'ascite en eau physiologique sont réalisées. Pour chacune des dilutions effectuées, la cinétique de la réaction de PCR est suivie en temps réel afin de déterminer le cycle seuil correspondant. On trace ensuite la droite d'étalonnage exprimant les variations du Ct en fonction de la quantité de parasite contenu dans chaque point de gamme. Pour un échantillon donné, le nombre de toxoplasmes est déduit du Ct obtenu (Heid et al, 1996). Un autre procédé permettant d'établir une gamme standard consiste à cloner le fragment d'intérêt. La quantité d'ADN est ensuite

déterminée par spectrophotométrie à 260 nm. Sachant qu'un tachyzoïte équivaut à 0.1 picogramme d'ADN (Cornelissen et al, 1984), il est possible d'en déduire le nombre de parasites présents dans l'échantillon.

Si l'intérêt d'une technique de PCR est évident pour le diagnostic anténatal, celui de la quantification de l'ADN parasitaire n'a pas encore été démontré. Le nombre de parasites dans le liquide amniotique est très variable, allant de 0.1 à 20.000 toxoplasmes / ml. Cependant, pour la majorité des échantillons la charge parasitaire reste faible. Elle est inférieure à 10 tachyzoïtes / ml dans 41 à 46 % des cas et comprise entre 10 et 100 tachyzoïtes / ml dans 30 à 55 % des cas (Costa et al, 1999 ; Costa et al, 2001). Costa constate qu'en présence d'une anomalie à l'échographie, le nombre de toxoplasmes est supérieur à 1000 / ml de liquide amniotique dans 4 cas sur 6. Ces résultats doivent être confirmés avec le suivi postnatal des enfants et sur un échantillonnage plus important. L'interprétation de l'intensité de la charge parasitaire devra prendre en compte d'autres paramètres, en particulier l'âge gestationnel au moment de l'infection maternelle (en rapport avec le taux de transmission) et le délai écoulé entre la séroconversion et l'amniocentèse.

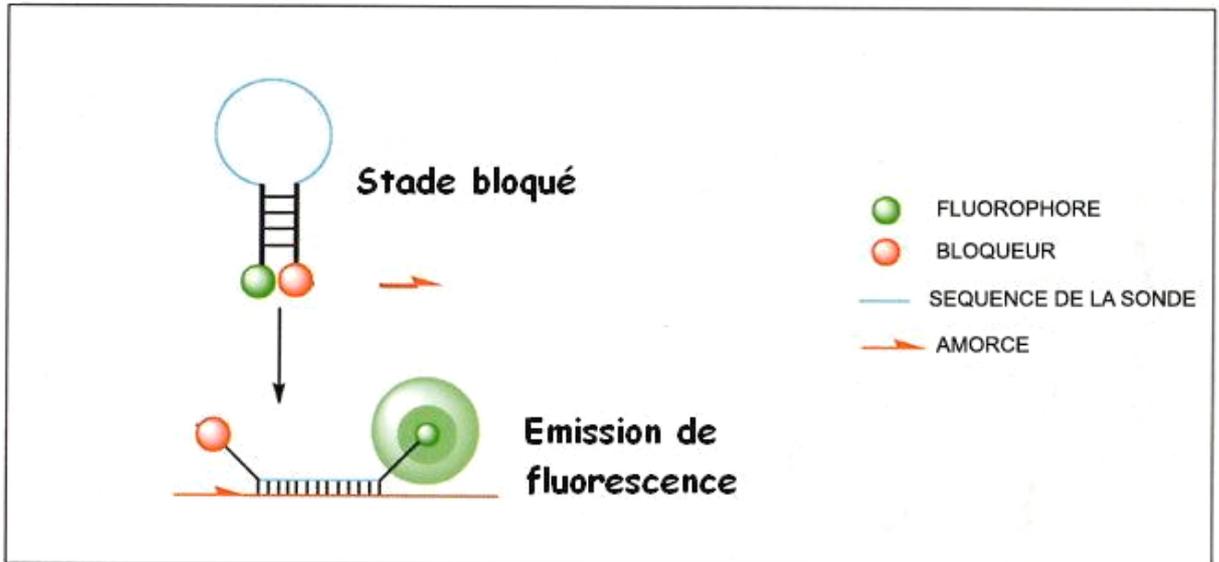
Les études quantitatives ont été essentiellement menées chez l'animal et semblent prometteuses en pathologie humaine (Jauregui et al, 2001 ; Flori et al, 2002 ; Flori et al, 2003).

La PCR en temps réel est aujourd'hui l'outil de choix dans la quantification des acides nucléiques. Les premières études laissent espérer que la détermination de la charge parasitaire par cette technique puisse devenir un critère d'évaluation de la gravité de l'infection et de l'efficacité du traitement. Les thèmes de recherche dans ces domaines sont vastes et feront très certainement l'objet d'investigations multiples dans un futur proche.

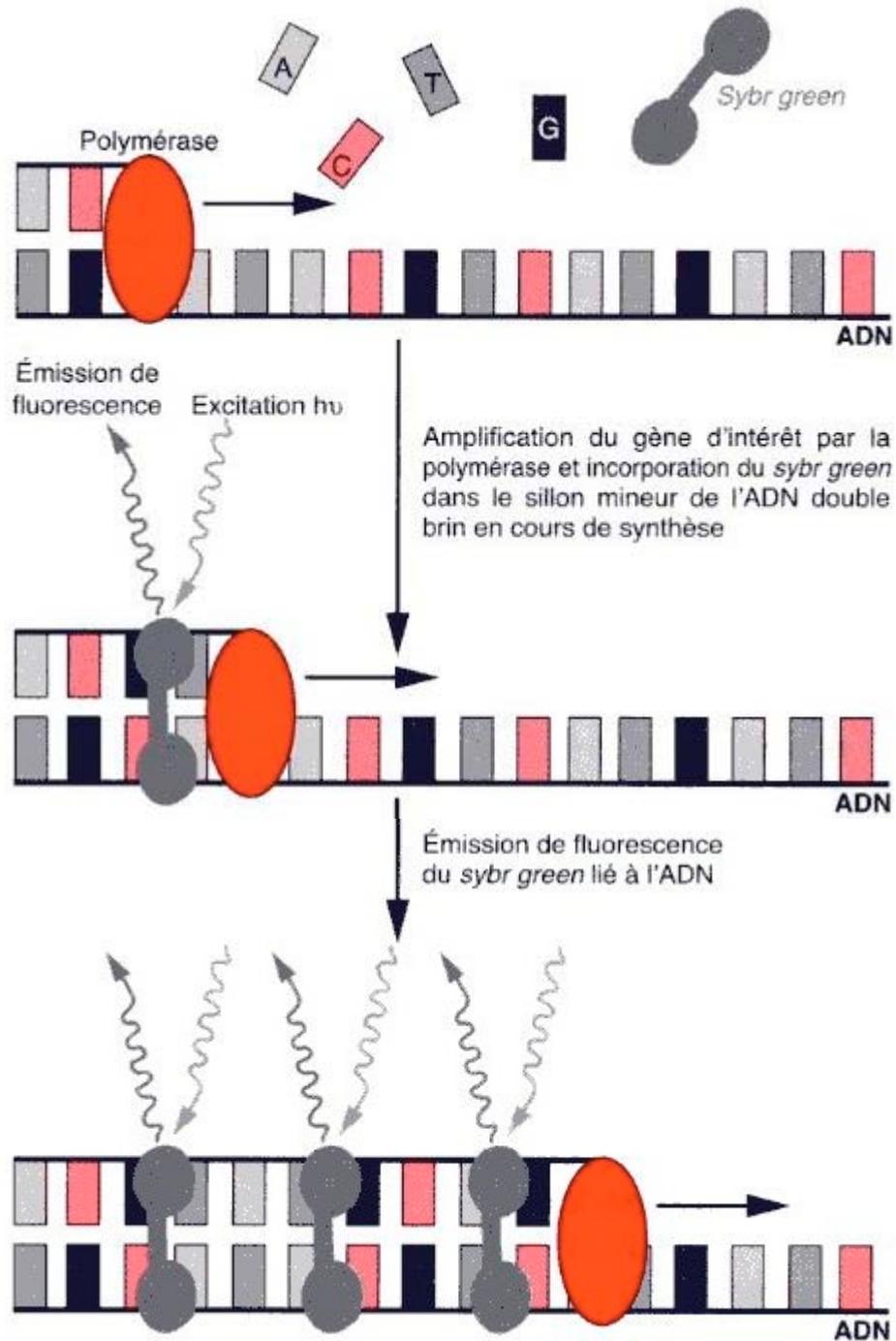
PARTIE III :

ANNEXES

ANNEXE I: Schéma du mécanisme de fluorescence des sondes *beacon* (sondes conformationnelles).



ANNEXE II : Schéma du mécanisme de fluorescence du *sybr green* (intercalant de l'ADN).



ANNEXE III : Les systèmes de PCR en temps réel (Tse et al, 2003).

	ABI Prism (Applied Biosystems)			LightCycler (Roche)	MX-4000 (Stratagene)	iCycler (Bio-Rad)	SmartCycler (Eurogentec)	Rotor-Gene (Corbett Res.)	DNA Engine Opticon (MJ Research)
	7700	7900	7000						
Thermocycleur									
Type	Effet Joule + Groupe froid	Effet Peltier	Effet Peltier	Air pulsé	Effet Peltier + Effet Joule	Effet Peltier + Effet Joule	Bloc 16 modules iCore™	Air pulsé	Effet Peltier + Effet Joule
Précision température	± 0,25 °C	± 0,25 °C	± 0,1 °C	± 0,3 °C	-	± 0,3 °C	± 0,5 °C	± 0,5 °C	± 0,3 °C
Uniformité température	± 0,5 °C	± 0,5 °C	± 0,1 °C	± 0,1 °C	± 0,25 °C	± 0,4 °C	± 0,5 °C	± 0,01 °C	± 0,4 °C
Rampes température	1 °C/sec	1 °C/sec	5 °C/sec	20 °C/sec	2 °C/sec	3 °C/sec	chauffage 10 °C/sec refroidissement 2,5 °C/sec	2 °C/sec	3 °C/sec
Durée d'un run	40 cycles/120 min	40 cycles/120 min	40 cycles/75 min	40 cycles/60 min	40 cycles/90 min	40 cycles/90 min	40 cycles/40 min	40 cycles/50 min	40 cycles/90 min
Capacité	96 tubes	96-384 tubes	96 tubes	32 capillaires	96 tubes	96-384 tubes	16 → 16 x 6 tubes	36-72 tubes	96 tubes
Module détection									
Lampe	Laser-argon (480-560 nm) Fibres optiques	Laser-argon (480-560 nm) Fibres optiques	Halogène (350-750 nm) Filtre BP 485 nm	1 LED (450-490 nm) Filtre BP 470 nm	Halogène (350-750 nm) 4 filtres BP	Halogène (400-700 nm) Roue à 4 filtres	4 LED (470, 510, 530, 575 nm) 2 filtres BP	4 LED (470, 530, 585, 625 nm), 4 filtres BP	96 LED (450-490 nm) Filtre BP 470 nm
Détecteur	Fibres optiques Spectrographe + CCD	Fibres optiques Spectrographe + CCD	Roue à 4 filtres CCD - 2D refroidie	3 filtres BP 530, 640 et 710 nm 3 photodiodes	Fibres optiques + 4 filtres BP 4 PMT	Roue à 4 filtres + Intensificateur CCD	4 filtres BP 4 photodiodes	4 filtres BP + 2 filtres BP large 4 PMT	Filtre BP 530 1 PMT
Mode détection (mode d'analyse)	Séquentiel (puits par puits)	Simultané (sur 96 positions)	Simultané (sur 96 positions)	Simultané (par capillaire)	Simultané (puits par puits)	Simultané (sur 96 positions)	Simultané	Simultané (tube par tube)	Simultané (sur 96 positions)
Logiciel analyse									
Suivi en réel	Non	Oui	Oui*	Oui*	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Analyse données	Oui**	Oui**	Oui [§]	Oui [§]	Oui**	Oui***	Oui	Oui***	Oui
Courbe de fusion	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Autres	Dessin sondes Taqman™	Dessin sondes Taqman™	Dessin sondes Taqman™ Bplexing	Dessin sondes FRET en tandem Bplexing	Dessin sondes Beacon™ Multiplexing	Dessin sondes Beacon™ Multiplexing	Multiplexing	Multiplexing	Monocouleur
Chimies	SYBR™ Green I Sonde TaqMan™	SYBR™ Green I Sonde TaqMan™	SYBR™ Green I Sonde TaqMan™	SYBR™ Green I Sonde FRET	Toutes, sauf sondes FRET	Toutes, sauf sondes FRET	Toutes	Toutes	SYBR™ Green I

LED : light emitting diode ; BP : bande passante ; CCD : camera charge-coupled device ; CCD - 2D : CCD bidimensionnel ; PMT : tube photomultiplicateur ; * avec algorithme matériel pour calibration des fluorophores ; ** normalisation par ROX™ ; *** calibration dynamique ; § avec logiciel ReliQuant™ pour quantification relative avec correction de l'efficacité d'amplification

**ANNEXE IV : Méthode d'extraction par le kit High Pure PCR
Template Préparation (Roche Diagnostic).**

Dans un premier temps, chaque culot obtenu par centrifugation de 2ml de liquide amniotique est repris par 200µl de PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Etape 1	Mélanger : le culot repris par 200µl de PBS + 200µl de tampon binding buffer + 40µl de protéine kinase
Etape 2	Vortexer Incuber à 72°C en bain marie à sec pendant 10min
Etape 3	Ajouter 100µl d'isopropanol (précipitant) Vortexer
Etape 4	Déposer l'échantillon sur le bord inférieur d'une colonne placée sur un tube collecteur Centrifuger à 8000 tours par min (tpm) pendant 1 min à 12°C
Etape 5	Déposer la colonne sur un nouveau tube collecteur + 500µl de tampon Inhibiteur Removal Buffer Centrifuger dans les mêmes conditions que ci-dessus
Etape 6	Déposer la colonne sur un nouveau tube collecteur + 500µl de tampon de lavage Centrifuger comme ci-dessus Répéter cette étape de lavage une fois
Etape 7	Eliminer le liquide collecté et centrifuger de nouveau à 14000 tpm, pendant 10 secondes à 4°C
Etape 8	Placer la colonne sur un tube de 1.5 ml + 50µl tampon d'élution préchauffé à 70°C Centrifuger à 8000 tpm pendant 1min à 4°C
Etape 9	Aliquoter et congeler l'éluat à -20°C

ANNEXE V : Séquence complète du gène B1 de *Toxoplasma gondii* et position des amorces TOXO F et TOXO S utilisées, à l'intérieur du gène.

```

1 GAATTCGTTT GACAGAAAGG GAGCAAGAGT TGGGACTAAA TCGAAGCTGA GATGCTCAA
EcoRI
61 GTCGACCGCG AGATGCACCC GCAGAAGAAG GGCTGACTCG AACCAGATGT GCTAAAGGCG
121 TCATTGCTGT TCTGTCCTAT CGCAACGGAG TTCTTCCGAG ACGTGGATTT CCGTTGGTTC
181 CGCCTCCTTC GTCCGTCGTA ATATCAGGCC TTCTGTCTCG TCGCTGTCT GTCTAGGGCA
241 CCCTTACTGC AAGAGAAGTA TTTGAGGTCA TATCGTCCCA TGAAGTCGAC CACCTGTTTC
301 CTCTCTTCAC TGTCACGTAC GACATCGCAT TCAAGGGAAG AGATCCAGCA GATCTCGTTC
361 GTGTATTGCA GACAAGAGAG GTCCGCCCCC ACAAGACGGC TGAAGAATGC AACATTCTTG
421 TGCTGCCTCC TCTCATGGCA AATGCCAGAA GAAGGTACG TGTTCATCA TAACAAGAGC
intron start
481 TGTATTTCCT GCTGGCAAAT ACAGGTGAAA TGTACCTCCA GAAAAGCCAC CTAGTATCGT
541 GCGGCAATGT GCCACCTCGC CTCTTGGGAG AAAAAGAGGA AGAGACGCTG CCGCTGTTTT
601 GCAAATGAAA AGGATTCATT TTCGCAGTAC ACCAGGAGTT GGATTTTGTA GAGCGTCTCT
661 CTTCAAGCAG CGTATTGTCG AGTAGATCAG AAAGGAACTG CATCCGTTCA TGAGTATAAG
oligo #1
721 AAAAAAATGT GGAATGAAA GAGACGCTAA TGTGTTTGCA TAGGTTGCAG TCACTGACGA
oligo #2
781 GCTCCCTCT GCTGGCGAAA AGTGAATTC ATGAGTATCT GTGCAACTTT GGTGTATTCCG
oligo #3
841 CAGATTGGTC GCCTGCAATC GATAGTTGAC CACGAAAGCT TTAAGAACA GGAGAAGAAG
intron end
901 ATCGTGAAAG AATACGAGAA GAGGTACACA GAGATAGAAG TCGCTGCGGA GACAGCGAAG
961 ACTGCGGATG ACTTCACTCC CGTCGCACCA GCAGCAGAGG AGTGCCGGGC AAGAAAATGA
1021 GATGCCTAGA GGAGACACAG CGTGTATGA ACAAATCTAT TGAGGTTTCG CGAAGAGGAG
1081 GGAACATATT ATATACAGAA GAAGAACAAG AGACGTGCCG CATGTGCTA AGCCATCGGA
1141 AGGGATGCTC AGAAAATGGC ACAGTATCAC ATTACAGTTC CGTTGATTCC TCTGATGGTG
1201 ACGAAAGGGG AAGAATAGTT GTCGCACCAA AACTGGCTAG TTGTTATTTT GAAGAAGACG
1261 AGAGATGGAG TGAACCACCA AAAATCGGAG AAAATCGATG GTGTCACGTT TTTTGTGAGA
1321 CTTCACTTTG TGCAGAAGCA TTGCCCGTCC AAATGCAAC AACTGCTCTA GCGTGTTCGT
1381 CTCCATCCG TACAGTCTTC AAAAATACAA AAGAGAACAT TCCAGCAACT TCTGCCTTTG
A poly A site
1441 TTCTTTTAGC CTCAATAGCA GGATGACGCC TCCCTCCTAT CTTCAGCCA ACCCAGCAA
1501 CACCGACGAA CTCTCTGTAG AGTAACAAAG AGAAGGCAAA ACGCGCCATC ACGAACACTC
1561 GCAGAGATGA TACAGAGACG TGTATCAGG ACAAGGTTGG TCGCTTAATT TTCTGTATAT
1621 AGCATTTTTA GAATGCACCT TTCGGACCTC AACAACCGTG CAAAAGGATC GCCACCTGGT
1681 GTCTCTTCAA GCGTCAAAAC GAACTATCTG TATATCTCTC AAGGAGGACT GGCAACCTGG
1741 TGTCGACAAAC AGAACAGCTG CAGTCCGAA ATAGAAAGCC ATGAGGCACT CCAACGGGCG
1801 AGTAGCACCT GAGGAGATAC AAATGCTAA ACGGTCCGGG TGAACAATA GAGAGTACTG
1861 GAACGTCGCC GCTACTGCCC AGTTGTCATG CCATCGACGT AGACCCAGAA ATGAGGCGAG
1921 AAATTAATAT TGTTAGTAAA GCATTCAAAA AGTTCCGGTC GAGAGGCTAA ACCACAAAAG
1981 TGCAAACCAT GCGCAGCCAT CAGCTAACA AAAGCAGTTG GTGATGGTTG CCTCGAGTTC
2041 CTTCTGAAAA TGGATTACTT CATCAACGAG CCCACCACGC AGAATCATGC TTTCCAGTG
2101 CTAAGCGTT TCTAAAGTAG CCGCACAATG CGGAATGCTA AGGGGATCGC CTACGTAGCA
2161 CATGTTGTGC CTCACCCCCC AGCTCGTGCG CTCATTCTCC TTTCGTGCGC GGCT(GAATTC)
EcoRI

```

ANNEXE VI : Description et fonctionnement du Rotor-Gene.

1) Le thermocycleur à air pulsé

Il comporte 36 ou 72 puits de réaction selon les modèles. L'air ambiant est insufflé dans une enceinte hermétique, chauffée au moyen d'une résistance électrique, puis homogénéisé par la force centrifuge. En effet, pendant son fonctionnement le rotor tourne aux alentours de 500 rotations par minute pour les montées en température et 1000 tours par minute pour les descentes. La combinaison de l'air pulsé et des mouvements du rotor maintient une uniformité de température supérieure à celle obtenue avec les autres thermocycleurs (+/- **0.01°C** entre les puits). De ce fait, il y a quasiment aucune variation de température d'un échantillon à l'autre : facteur déterminant dans la précision et la reproductibilité de la PCR. Ainsi, les variations du rendement d'amplification itinérantes à une absence d'uniformité de la température sont éliminées. Ceci explique que le Rotor-Gene ne nécessite pas de marqueur de référence passif.

Avec les autres appareils, ces marqueurs passifs type ROX, sont incorporés dans chaque tube de réaction. Ils permettent de normaliser les variations de fluorescence, qu'ils subissent en même temps que le rapporteur, dues aux variations de température ou d'enregistrement au niveau de la caméra.

2) Le module de détection

A chaque passage devant la cellule de détection, le milieu réactionnel est excité par une source d'énergie lumineuse : une lampe électronique. Elle produit un faisceau lumineux très intense la rendant très sensible. La fluorescence émise est collectée par un photomultiplicateur (la longueur d'onde d'émission est sélectionnée grâce à la présence de canaux munis d'un filtre de détection). Il détecte les signaux émis avec une très grande sensibilité et un faible bruit de fond. Les données sont ensuite envoyées à l'ordinateur et analysées par un logiciel approprié. Il calcule ainsi la moyenne des rayonnements émis de chaque échantillon en fonction du nombre de cycles. Les données s'affichent alors en temps réel sur l'écran

**ANNEXE VII : Critères de sélection des liquides amniotiques testés :
1^{ère} application de la PCR en temps réel.**

Liquide amniotique	Année	Culture cellulaire	Inoculation à la souris	PCR-DEIA	
				DOe / DOs	Résultat
1	1999	NEG	NEG	0.55/0.18	+
2	1999	NEG	NEG	>3	+
3	1999	POS	POS	>3	+
4	1999	POS	POS	>3	+
5	1999	POS	POS	>3	+
6	1999	NR	POS	>3	+
7	1999	NR	POS	>3	+
8	1999	NR	POS	>3	+
9	1999	NEG	POS	>3	+
10	1999	NEG	NEG	>3	+
11	1999	NEG	NEG	0.23 / 0.21	+
12	1999	NEG	NEG	0.19 / 0.17	+
13	1999	NEG	NEG	0.9 / 0.17	+
14	2000	NR	NEG	0.20 / 0.16	+
15	2000	POS	NEG	>3	+
16	2000	NEG	POS	>3	+
17	2000	POS	POS	>3	+
18	2000	NEG	NEG	0.12 / 0.17	-
19	2000	NEG	NEG	>3	+
20	2001	NEG	POS	2.16 / 0.16	+
21	2001	NR	DCD	>3	+
22	2002	NR	NEG	>3	+
23	2002	NR	POS	>3	+
24	2002	NR	POS	>3	+
25	2002	NR	POS	>3	+
26	2003	NR	DCD	>3	+
27	2003	NR	NEG	0.073 / 0.18	-
28	2003	NR	NEG	0.088 / 0.17	-
29	2003	NR	NEG	0.092 / 0.18	-
30	2003	NR	NEG	0.094 / 0.15	-

Légende:

NEG, - : résultat négatif

POS, + : résultat positif

NR : technique non réalisée

DCD : souris décédées en quelques jours

DOe : densité optique de l'échantillon analysé

DOs : densité optique seuil

>3 : densité optique élevée (overflow), supérieure à la limite de détection de la méthode

ANNEXE VIII : Protocole opératoire initial de la PCR en temps réel appliqué aux liquides amniotiques dans le cadre du diagnostic anténatal de la toxoplasmose.

1) Prétraitement des échantillons de liquide amniotique

Un volume d'environ 2 ml de liquide amniotique est centrifugé 5 minutes à 10.000 tours par minute à une température de 12°C. Le surnageant est décanté afin d'obtenir un culot. Pour un liquide amniotique, on essaye ainsi d'obtenir au moins 3 culots ; le premier est extrait et utilisé directement, le second est congelé à -20°C et le troisième est congelé à -80°C (obligation légale).

2) Extraction

Le procédé d'extraction correspond au kit Roche, High Pure PCR Template Préparation Kit dont les étapes sont regroupées dans l'annexe IV.

3) Témoin

Un témoin négatif de réaction est ajouté à chaque série de PCR en position 1 sur le rotor. De l'eau distillée est ajoutée à la place de l'échantillon à tester

4) Préparation du Mix

Pour une amplification (1 tube)			
MIX DETECTION	Concentration initiale	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon 10 X	10 X	2.5	1 X
dNTP	200 µM	2.5	20 µM
MgCl₂	25 mM	3	3 mM
TOXO S	5 µM	2.5	0.5 µM
TOXO F	2 µM	2.5	0.2 µM
TOXO R	2 µM	2.5	0.2 µM
HotPrime™ polymérase	5 U/µl	0.1	
Eau distillée		4.4	
Extrait à analyser		5	
volume final		25	

5) Protocole d'amplification

Le programme d'amplification du Rotor-Gene est préenregistré. Il 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 50 fois) :

- dénaturation à 95°C pendant 15 secondes.
- hybridation et élongation à une température de **65°C** pendant 60 secondes.

6) Résultats

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.

ANNEXE IX : Détermination de l'efficacité de la PCR en temps réel à 63°C et pour une concentration en MgCl₂ de 3 mM.

Quantitation Report

Experiment Information

Experiment Name	
Experiment Start	
Experiment Finish	
Operator	
Notes	toxoplasme, 63°C, 3 mM
Gain CH1	4
Gain CH2	6
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Noise Slope Correction	Yes
Start normalising from cycle	1
Digital Filter	Light
Threshold	0.0088
Left Threshold	1
Standard Curve	conc= 10 ^(-0.284*CT + 7.571)
Reaction efficiency (*)	0.92 (* = 10 ^(-m) - 1)
R Value	0.9374
No Template Control Threshold	0.0% (0FI)

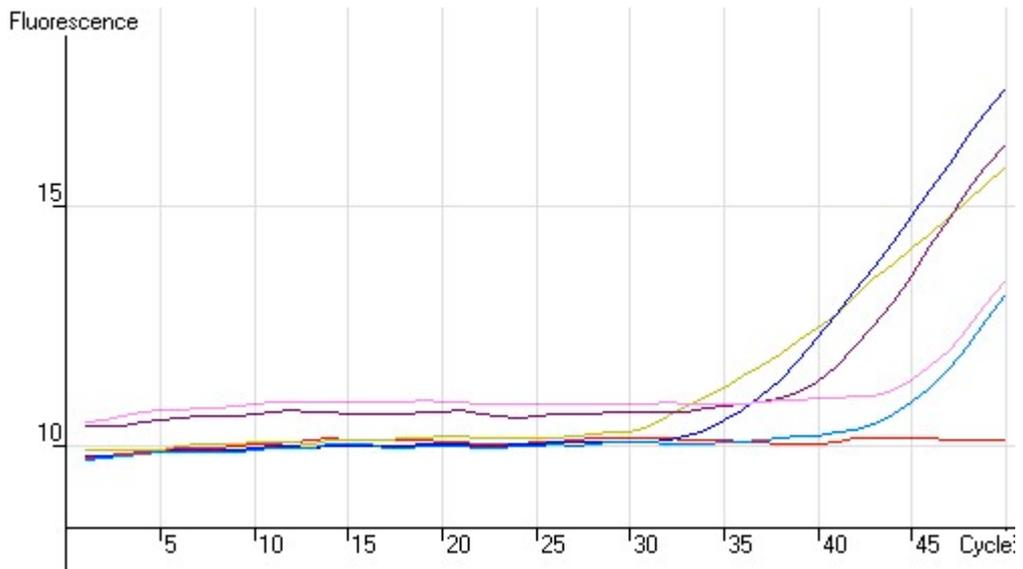
Messages

Message

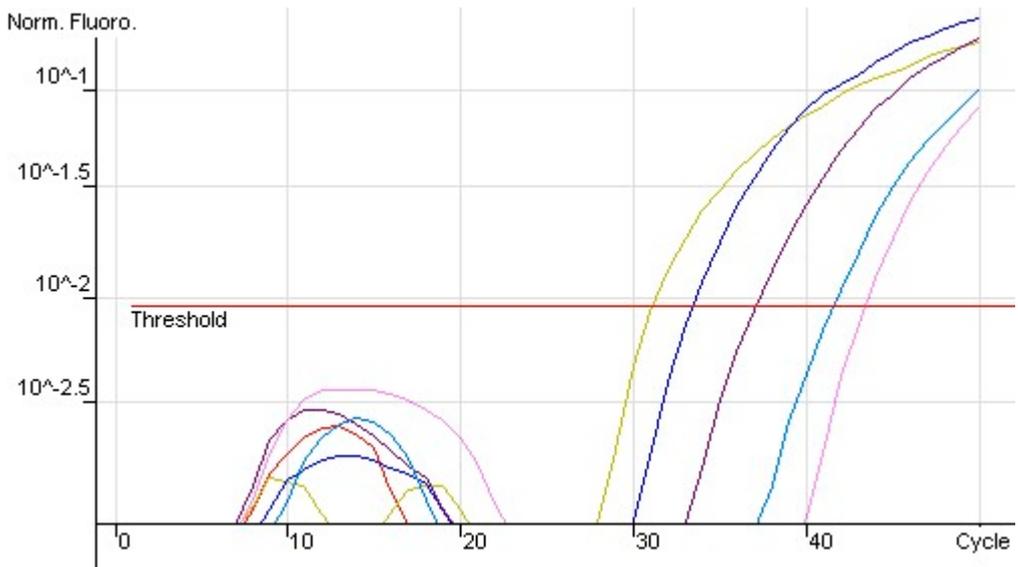
Temperature Profile

Cycle	Cycle Point
Cycling (1 repeats)	Step 1 @ 95 deg., hold 900 secs
Cycling 2 (50 repeats)	Step 1 @ 95 deg., hold 15 secs
	Step 2 @ 63 deg., hold 60 secs, acquiring to Cycling A(CH1)

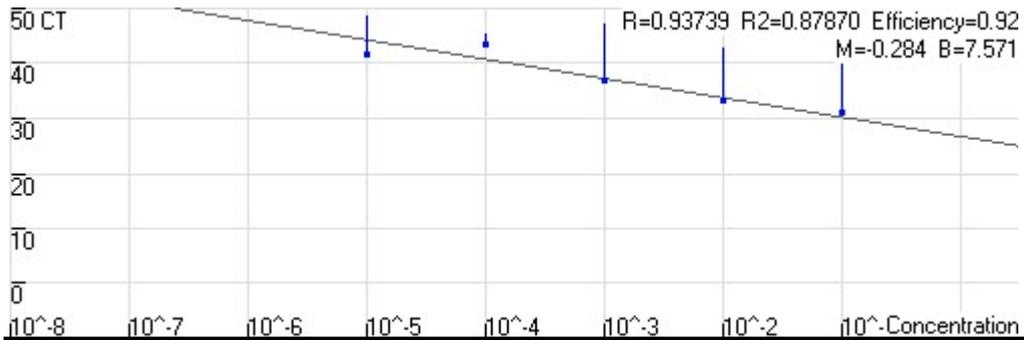
Raw data for Cycling A.CH1



Quantitation data for Cycling A.CH1



Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Given Conc. (Copies)	Calculated Conc. (Copies)	CV	Ct	Ct Std. Dev.
1	Orange	T- 3mM	NTC					
2	Yellow	solution 1	Standard	.1000000	.0577261	42.27%	31.04	
3	Blue	solution 2	Standard	.0100000	.0130950	30.95%	33.31	
4	Purple	solution 3	Standard	.0010000	.0011367	13.67%	37.05	
5	Pink	solution 4	Standard	.0001000	.0000190	80.99%	43.31	
6	Light Blue	solution 5	Standard	.0000100	.0000612	512.30%	41.52	

This report generated by Rotor-Gene Real-Time Analysis Software
 (C)Corbett Research 2000
 (R)All Rights Reserved

ANNEXE X : Sensibilité de la PCR en temps réel : protocole opératoire appliqué aux solutions de toxoplasmes obtenues à partir de l'ascite de souris.

1) Préparation des dilutions

Nous avons réalisé des dilutions successives de la solution concentrée à 90.000 toxoplasmes/ μ l afin d'obtenir une gamme de suspensions en eau physiologique allant de 450.000 à 0.05 toxoplasmes selon les modalités ci-dessous :

Solution	Concentration (toxoplasmes/μl)	Facteur de dilution	Nombre de toxoplasmes pour une prise d'essai de 5μl
A	90 000	1	450 000
B	900	100	4500
C	90	10	450
D	20	4.5	100
E	10	0.5	50
F	5	0.5	25
G	2	2.5	10
H	1	0.5	5
I	0.2	1.5	1
J	0.1	0.5	0.5
K	0.01	10	0.05

Un volume de 25 μ l de chaque solution est ajouté à 1.75 μ l d'eau physiologique afin de se rapprocher de la composition et des conditions du traitement d'un liquide amniotique.

2) Prétraitement des échantillons

Les 2 ml de chaque solution sont centrifugés 5 minutes à 12°C à la vitesse de 10.000 tours par minute. Le surnageant est décanté afin d'obtenir un culot.

3) Extraction de l'ADN

Chaque culot est repris par 25 μ l de tampon de lyse et soumis aux étapes d'extraction proprement dites :

- chauffage 5 min à 100°C,
- centrifugation : 5 minutes à 14000 tours / min à la température de 12°C, afin d'éliminer les débris cellulaires et les impuretés,
- le surnageant est décanté et utilisé comme extrait contenant une certaine quantité d'ADN toxoplasmique.

5) Les témoins

Deux contrôles sont introduits dans chaque série d'amplification :

- un témoin négatif de réaction, l'échantillon extrait est remplacé par de l'eau distillée stérile,
- un témoin de l'absence d'inhibiteur de la réaction de PCR (IPC).

6) Préparation du Mix

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

Pour une amplification (1 tube)

MIX DETECTION + IPC	Concentration initiale	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon 10 X	10 X	2.5	1 X
dNTP	200 µM	2.5	20 µM
MgCl₂	25 Mm	3	3 Mm
TOXO S	5 µM	2.5	0.5 µM
TOXO F	2 µM	2.5	0.2 µM
TOXO R	2 µM	2.5	0.2 µM
IPC Mix (primers et sonde)	10 X	2.5	1 X
IPC DNA 50X	50 X	0.5	5 X
HotPrime™ polymérase	5 U/µl	0.1	
Eau distillée		1.4	
Extrait à analyser		5	
volume final		25	

7) Protocole d'amplification

Le programme d'amplification du Rotor-Gene est préenregistré. Il 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 50 fois) :

- dénaturation à 95°C pendant 15 secondes
- hybridation et élongation à une température de **63°C** pendant 60 secondes.

8) Résultats

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 interne positif (IPC).

ANNEXE XII : Protocole opératoire complet et définitif de la PCR en temps réel appliqué aux liquides amniotiques dans le cadre du diagnostic anténatal de la toxoplasmose.

1) Objet

Amplification et révélation de l'ADN toxoplasmique à partir d'un liquide amniotique.

2) Domaine d'application

Concerne l'ensemble des techniciens de laboratoire désignés pour la PCR, ainsi que les internes formés.

3) Arrivée des liquides amniotiques au laboratoire

Les liquides amniotiques doivent être acheminés au laboratoire le plus rapidement possible à température ambiante. Un volume d'environ 20 ml est nécessaire et doit être séparé en deux prélèvements distincts. L'un est utilisé pour l'inoculation à l'animal, l'autre chemine par une voie spécifique destinée au traitement des prélèvements par une technique de biologie moléculaire.

4) Prétraitement des échantillons

Un volume de 2ml de liquide amniotique est centrifugé 5 minutes à 12°C à la vitesse de 10.000 tours par minute. Le surnageant est décanté afin d'obtenir un culot. Pour un liquide amniotique, on essaye ainsi d'obtenir au moins 3 culots ; le premier est extrait et utilisé directement, le second est congelé à -20°C et le troisième est congelé à -80°C (obligation légale).

5) Extraction

5.1) Préparation du tampon d'extraction :

- * 100 ml d'eau distillée
- * 10 µl d'hydroxyde de sodium
- * 50 µl de NP40
- * 50 µl de TWEEN 20

La préparation est stable durant 8 jours.

5.2) Extraction proprement dite

- chaque culot de centrifugation est repris par 25µl de tampon d'extraction,
- chauffer 5 minutes à 100°C,
- centrifuger 5 minutes à 14000 tours / min à la température de 12°C,
- décanter le surnageant. Celui-ci peut être aliquoté et congelé.

6) Les témoins

Deux contrôles sont introduits dans chaque série d'amplification :

- un témoin **négatif** de réaction, l'échantillon extrait est remplacé par de l'eau distillée stérile,
- **un témoin de l'absence d'inhibiteur** de la réaction de PCR (IPC).

7) Préparation du Mix

La réaction de PCR se déroule dans un volume de 25 µl, avec une **prise d'essai** de **5µl** pour l'échantillon à analyser.

Pour une amplification (1 tube)

MIX DETECTION + IPC	Concentration initiale	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon 10 X	10 X	2.5	1 X
dNTP	200 µM	2.5	20 µM
MgCl ₂	25 mM	3	3 mM
TOXO S	5 µM	2.5	0.5 µM
TOXO F	2 µM	2.5	0.2 µM
TOXO R	2 µM	2.5	0.2 µM
IPC Mix (primers et sonde)	10 X	2.5	1 X
IPC DNA 50X	50 X	0.5	5 X
HotPrime™ polymérase	5 U/µl	0.1	
Eau distillée		1.4	
Extrait à analyser		5	
volume final		25	

8) Protocole d'amplification

Le programme d'amplification du Rotor-Gene est préenregistré. Il 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 50 fois**) :

- dénaturation à 95°C pendant 15 secondes,
- hybridation et élongation à une température de **63°C** pendant 60 secondes.

8) Résultats

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 interne positif (IPC).

**ANNEXE XIII : Critères de sélection des liquides amniotiques testés :
2^{ème} application de la PCR en temps réel.**

Liquide amniotique	Année	Culture cellulaire	Inoculation à la souris	Simple PCR (détection au B.E.T sur gel de polyacrylamide)
31	1995	NEG	POS	+
32	1995	NR	POS	+
33	1996	NR	POS	+
34	1996	NR	POS	+
35	1996	NR	POS	+
36	1996	POS	POS	+
37	1996	POS	POS	+
38	1996	NEG	NEG	+
39	1996	NR	NEG	-
40	1996	NEG	POS	+
41	1996	NR	NEG	-
42	1996	POS	POS	+
43	1996	NR	NEG	-
44	1996	NEG	POS	+
45	1996	NEG	POS	+
46	1997	NR	POS	+
47	1997	NR	NEG	-
48	1997	NEG	POS	+
49	1997	POS	POS	+
50	1997	NEG	NEG	+
51	1997	NEG	POS	+
52	1997	NR	NEG	-
53	1997	NR	POS	+
54	1997	POS	POS	+
55	1997	NEG	NEG	+
56	1998	NEG	NEG	-
57	1998	NR	NEG	+
58	1998	NEG	POS	+
59	1998	POS	NEG	+
60	1998	NEG	POS	+

Liquide amniotique	Année	Culture cellulaire	Inoculation à la souris	PCR-DEIA	
				DOe / DOs	Résultat
61	2003	NR	NEG	-	0.066 / 0.17
62	2003	NR	NEG	-	0.076 / 0.18
63	2003	NR	NEG	-	0.024 / 0.17
64	2003	NR	NEG	-	0.031 / 0.17
65	2003	NR	NEG	-	0.025 / 0.16
66	2003	NR	NEG	-	0.030 / 0.20
67	2003	NR	POS	+	>3
68	2003	NR	NEG	-	0.018 / 0.15
69	2003	NR	NEG	-	0.039 / 0.18
70	2003	NR	NEG	-	0.026 / 0.18
71	2003	NR	NEG	-	0.025 / 0.18

Légende:

NEG, - : résultat négatif

POS, + : résultat positif

NR : technique non réalisée

DCD : souris décédées en quelques jours

DOe : densité optique de l'échantillon analysé

DOs : densité optique seuil

>3 : densité optique élevée (overflow), supérieure à la limite de détection de la méthode.

BIBLIOGRAPHIE

- Ancelle T, Goulet V, Tirard-Fleury V, Baril L, du Mazaubrun C, Thulliez P, Wisclo M, Carne B. (1996). La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. BEH, 51.
- Bernard P.S, Wittwer C.T. (2002). Real-time PCR technology for cancer diagnostics. Clin Chem 48, 1178-85.
- Bessières M.H, Roques C., Berrebi A., Barre V., Cazaux M. and Seguela J.P. (1992). IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. J Clin Pathol 45(7), 605-8.
- Boom R, Sol C.J, Salimans M.M, Jansen C.L, Wertheim-van Dillen P.M and van der Noordaa J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 28(3), 495-503.
- Bommer W. (1969). The life cycle of virulent *Toxoplasma* in cell cultures. Aust J Exp Biol Med Sci 47, 505-512.
- Bonhomme A, Pingret L and Pinon J.M. (1992). *Toxoplasma gondii* cellular invasion. Parasitologia 54, 31-43
- Boothroyd J.C, Burg J.L, Nagel D, Perelman D, Kasper L.H, Ware P.L, Prince J.B, Sharma S.D, Remington J.S. (1987). Antigen and tubulin genes of *Toxoplasma gondii*. UCLA Symp Mol Cell Biol 42, 237-250.
- Bretagne S, Costa J.M, Vidaud M, Tran J, Nhieu V, Fleury-Feith J. (1993). Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. J of Infectious Diseases 168, 1585-1588
- 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.
- Buchbinder S, Blatz R. and Christian Rodloff A. (2003). Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis 45(4), 269-71.
- Burg J.L, Perelman D, Kasper L.H, Ware P.L, Boothroyd J.C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J of Immunology 141, 3584-3591.
- Burg J.L, Christopher M, Grover C, Pouletty P, Boothroyd J.C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by PCR. J of Clin Microbiol 27, 1787-1792.
- Caplin B.E, Rasmussen R.P, Bernard P.S, Wittwer C.T. (1999). LightCycler™ hybridization probes. The most direct way to monitor PCR amplification for quantitation and mutation detection. Roche Mol Biochim 1, 5-8.

- Carme B, Lenne E, Tibard V, Hayette M.P, Gondry J. (1994). Etude épidémiologique de la toxoplasmose chez les femmes enceintes à Amiens (Picardie), nécessité d'une enquête nationale. B.E.H 38, 173-174.
- Carme B, Tibard-Fleury V. (1996). La toxoplasmose chez la femme enceinte en France : séroprévalence, taux de séroconversion et niveau de connaissance des mesures préventives. Tendances 1965-1995. Med Mal Infect 26, 431-436.
- Carter A.O, Gelmon S.B, Wells G.A and Toepell A.P. (1989). The effectiveness of a prenatal education programme for the prevention of congenital toxoplasmosis. Epidemiol Infect 103(3), 539-45.
- Cayouette M, Sucharczuk A, Moores J, Kramer F.R. (1999). Using molecular beacons to monitor PCR product formation. Stratagene 12, 85-9.
- Cazenave J., Forestier F, Bessieres M.H, Broussin B. and Begueret J. (1992). Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Prenat Diagn 12(2), 119-27.
- Cesbron-Delauw M.F, Guy B, Torpier G, Pierce R.J, Lenzen G, Cesbron J.Y, Charif, H, Lepage P, Darcy F, Lecocq J.P. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A 86(19), 7537-41.
- Chiappino M.L, Nichols B.A, O'Connor G.R. (1984). Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. J Protozool 31, 288-292.
- Christina N, Liaud M.F, Santoro F, Oury B, Ambroise-Thomas P. (1991). A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii* : cloning, sequence analysis, and uses in strain characterization. Experimental Parasitology 73, 73-81.
- Cimon B, Penn P, Brun S, Chabasse D. (2002). Comment résoudre les difficultés du sérodiagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte ? Immuno-analyse et Biologie spécialisée 17, 143-147.
- Clegg R.M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. Curr Opin Biotechnol 6(1), 103-10.
- Cornelissen A, Overdulve J.P, Van Der Ploeg M. (1984). Determination of nuclear DNA of five Eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E.acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis. J Parasitol 88, 531-553.
- Costa J.M, Thulliez P, Vidaud M. (1994). Toxoplasmose congénitale. Gyn Obs 316,16.
- Costa J.M, Ernault P, Bretagne S. (1999). Rapid and quantitative detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. Biochemica 3, 6-8.

- Costa J.M, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C and Bretagne S. (2000). Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J Clin Microbiol* 38(8), 2929-32.
- Costa J.M, Ernault P, Gautier E. and Bretagne S. (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, Sadak A, Fortier B, Dubremetz J.F. (1988a). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 97, 1-10.
- Couvreur J, Desmonts G and Thulliez P. (1988b). Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. *J Antimicrob Chemother* 22(Suppl B), 193-200.
- Couvreur J. (1993a). Toxoplasmose congénitale. Prise en charge et devenir. *Med Mal Infect* 23 spécial, 176-182.
- Couvreur J, Thulliez P, Daffos F, Aufrant C, Bompard Y, Gesquiere A and Desmonts G. (1993b). In utero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pyrimethamine-sulfadiazine. *Fetal Diagn Ther* 8(1), 45-50.
- Couvreur J. (1999). Le problème de la toxoplasmose congénitale : l'évolution sur quatre décennies. *La presse Médicale* 28, 753-757.
- Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Aufrant C, Valenti D and Cox W.L. (1988). Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med* 318(5), 271-5.
- Dannemann B.R, Vaughan W.C, Thulliez P and Remington J.S. (1990). Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 28(9), 1928-33.
- Derouin F, Mazon MC, Garin JP. (1987). Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin Microbiol* 25, 1597-600.
- Derouin F, Thulliez P. (1993). Diagnostic biologique de la toxoplasmose. *Laborama* 33, 5-17.
- Desire N, Dehee A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard P.M, Rozenbaum W and Nicolas J.C. (2001). Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 39(4), 1303-10.
- Desmonts G, Couvreur J. (1974). L'isolement du parasite dans la toxoplasmose congénitale : intérêt pratique et thérapeutique. *Arch Fr Pédiatrie* 31, 157-166.

- Desmonts G. (1982a). Toxoplasmose acquise de la femme enceinte. Estimation du risque de transmission du parasite et de la toxoplasmose congénitale. Lyon Med 248 hors série, 115-124.
- Desmonts G. (1982b). Prévention de la toxoplasmose: remarques sur l'expérience poursuivie en France. In: Marois M., ed. Prevention of physical and mental congenital defects. Part B. Epidemiology, early detection and therapy, environmental factors: proceedings of an international conference of the Institut de la Vie held in Strasbourg, France, 10-17, 1982. New-York : Alan R liss 1985; 333-337.
- Desmonts G, Couvreur J. (1984). Histoire naturelle de la toxoplasmose congénitale. Ann Pediatr 31, 799-802.
- Desmonts G, Couvreur J, Thulliez P. (1990). Toxoplasmose congénitale : cinq cas de transmission à l'enfant d'une infection maternelle antérieure à la grossesse. Presse Med 19, 1445-1449.
- Dubey J.P. (1977). *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. Parasitic protozoa 3rd ed, 101-237.
- Dubey J.P. (1996). Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J Parasitol 82, 957-960.
- Dubey J.P, Lindsay D.S, Speer C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoïtes, bradyzoïtes, and sporozoïtes and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Reviews 11 (2), 267-299.
- Duffy K.T, Wharton P.J, Johnson J.D, New L and Holliman R.E. (1989). Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting *Toxoplasma* specific IgM. J Clin Pathol 42(12), 1291-5.
- Dupouy-Camet J, Gavinet M.F, Paugam A, Tourte-Schaefer C. (1993a). Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. Med Mal Infect 23 spécial, 139-147.
- Dupouy-Camet J, de Souza S.L, Maslo C, Paugam A, Saimot A.G, Benarous R, Tourte-Schaefer C and Derouin F. (1993b). Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 31(7), 1866-9.
- Faure A.K, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A and Ambroise-Thomas P. (1999). Lack of value of specific IgA detection in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. J Clin Lab Anal 13(1), 27-30.
- Ferguson D.J.P, Dunachie W.M, Siim J.C. (1974). Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B 82, 167-181.

- Ferguson D.J.P, Hutchinson W.M, Siim J.C. (1975). The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B 83, 491-505.
- Ferguson D.J.P, Birch-Anderson, Siim J.C and Hutchinson W.M. (1978). Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initial of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B 86, 165-167.
- Ferguson D.J.P, Hutchinson W.M. (1987). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol Res 73, 483-491.
- Ferguson D.J.P, Hutchinson W.M, Pettersen E. (1989). Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. Parasitol Res 75, 599-603.
- Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C and Sung R.T. (2002). Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. J Med Microbiol 51(10), 871-8.
- Flori P, Hafid J, Thonier V, Bellete B, Raberin H and Tran Manh Sung R. (2003). Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. Parasite 10(2), 133-40.
- Fortier B, Aïssy E, Ajana F, Dieusart P, Denis P, Martin De Lassalle E, Lecomte-Houcke M, Vinatier D. (1991). Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*. Lancet 338, 444.
- Fortier B, Coignard-Chatain C, Soete M, Dubremetz JF. (1996). Structure et biologie des bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. CRS Soc Biol Fil 190, 385-394.
- Fortier B, Dao A, Ajana F. (2000). Toxoplasme et toxoplasmose. Encyl Méd Chir, Maladies infectieuses 8-509-A-10, Pédiatrie 4-330-A-10.
- Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon J.M, Jenum P.A, Hedman K and Naessens A. (1999a). 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.
- Foulon W, Pinon J.M, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum P.A, Hayde M and Naessens A. (1999b). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. Am J Obstet Gynecol 181(4), 843-7.
- Foulon W, Amboise-Thomas P, Pinon J.M. (2002). European Symposium on Congenital Toxoplasmosis.

- Frenkel J.K, Dubey J.P, Miller N.L. (1969). *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. Science 164, 432.
- Frenkel J.K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. BioScience 23, 343-352.
- Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Racinet C, Bost M, Goullier-Fleuret A and Ambroise-Thomas P. (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, Pelloux H, Muet F, Racinet C, Bost M, Goullier-Fleuret A and Ambroise-Thomas P. (1997). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparative value of fetal blood and amniotic fluid using serological techniques and cultures. Prenat Diagn 17(9), 831-5.
- Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Racinet C, Grefenstette I, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A and Ambroise-Thomas P. (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.
- Garin JF, Piens MA, Maisonneuve H. (1984). Toxoplasmose congénitale. Rev Ped 20(6), 279-287.
- Gavinet M.F, Robert F, Firtion G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin J.R, Tourte-Schaefer C and Dupouy-Camet J. (1997). Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. J Clin Microbiol 35(5), 1276-7.
- Gilbert R.E, Gras L, Wallon M, Peyron F, Ades A.E and Dunn D.T. (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.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR : applications to quantify cytokine gene expression. Methods 25, 386-401.
- Glazer A.N and Mathies R.A. (1997). Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. Curr Opin Biotechnol 8(1), 94-102.
- Golman M. (1957). Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. A new serological test for antibodies to *Toxoplasma* based upon inhibition of specific staining. J Exp Med 105, 549-573.
- Goulet V, LE Magny F, Iborra M. (1990). Enquête sur la connaissance des mesures préventives contre la toxoplasmose auprès de femmes venant d'accoucher. B.E.H 4, 14-15.
- Gras L, Gilbert R.E, Ades A.E and Dunn D.T. (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.

- Grover C.M, Thulliez P, Remington J.S and Boothroyd J.C. (1990). Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 28(10), 2297-301.
- Guay J.M, Dubois D, Morency M.J, Gagnon S, Mercier J and Levesque R.C. (1993). Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31(2), 203-7.
- Heid C.A, Stevens J, Livak K.J, Williams P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-94.
- Hennequin C, Dureau P, N'Guyen L, Thulliez P, Gagelin B, Dufier J.L. (1997). Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. *Pediatr Infect Dis J* 16, 75-77.
- Hezard N, Marx-Chemla C, Foudrinier F, Villena I, Quereux C, Leroux B, Dupouy D, Talmud M and Pinon J.M. (1997). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in 261 pregnancies. *Prenat Diagn* 17(11), 1047-54.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh P.S, Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechniques* 10, 413-7.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa J.M, Thulliez P, Forestier F and Vidaud M. (1994). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331(11), 695-9.
- Hohlfeld P, MacAleese J, Capella-Pavlovski M, Giovangrandi Y, Thulliez P, Forestier F and Daffos F. (1991). Fetal toxoplasmosis: ultrasonographic signs. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1(4), 241-4.
- Holland P.M, Abramson R.D, Watson R, Gelfand D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7276-80.
- Homan W.L, Vercammen M, De Braekeleer J and Verschuere H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30(1), 69-75.
- Hutchinson W.M, Dunachi J.F, Sim J.C, Work K. (1970). Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J* 1, 142.
- Jacobs L, Remington J.S and Melton M.L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 46, 11-21.

- James G.S, Sintchenko V.G, Dickeson D.J and Gilbert G.L. (1996). Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J Clin Microbiol* 34(6), 1572-5.
- Jauregui L.H, Higgins J, Zarlenga D, Dubey J.P and Lunney J.K. (2001). Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol* 39(6), 2065-71.
- Jenum P.A, Holberg-Petersen M, Melby K.K and Stray-Pedersen B. (1998). Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. The Norwegian experience. *Apmis* 106(7), 680-6.
- Johnson A.M, Murray P.J, Illana S, Baverstock P.R. (1987). Rapid nucleotide sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii*, evolutionary implications for the Apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology* 25, 239-246.
- Johnson A.M, Illana S, Mc Donald J.P, Asai T. (1989). Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *Gene* 85, 215-220.
- Johnson A.M and Illana S. (1991) Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. *Gene* 99(1), 127-32.
- Jones C.D, Okhravi N, Adamson P, Tasker S and Lightman S. (2000). Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(3), 634-44.
- Kasper L.H, Bradley M.S and Pfefferkorn E.R. (1984) Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J Immunol* 132(1), 443-9.
- Kasper L.H. (1989). Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 57(3), 668-72.
- Köhler T. (1992). General aspects and chances of nucleic acid Quantitation by PCR. In: Köhler T, Labner D, Rost A.K, Thamm B, Postowoit B, Remke H. Quantitation of mRNA by Polymerase chain reaction. Springer, 1-26.
- Kreuzer K.A, Bohn A, Peters U.R, Schmidt C.A. (2000). Influence of DNA polymerases on quantitation PCR results using TaqMan™ probe format in the LightCycler™ instrument. *Mol Cell Probes* 14, 57-60.
- Kupferschmidt O, Kruger D, Held T.K, Ellerbrok H, Siegert W and Janitschke K. (2001). Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microbio Infect* 7(3), 120-4.

- Lebech M, Andersen O, Christensen N.C, Hertel J, Nielsen H.E, Peitersen B, Rechnitzer C, Larsen S.O, Norgaard-Pedersen B and Petersen E. (1999). Feasibility of neonatal screening for *Toxoplasma* infection in the absence of prenatal treatment. Danish Congenital Toxoplasmosis Study Group. Lancet 353(9167), 1834-7.
- Lécolier B, Pucheu B. (1993). Intérêt de l'étude de l'avidité des IgG pour le diagnostic de la toxoplasmose. Path Biol 41 n°2, 155-8
- Levine N.V. (1988). The protozoan phylum *Apicomplexa*. UCRL Press, Inc Boca Raton, Florida.
- Liesenfeld O, Press C, Montoya J.G, Gill R, Isaac-Renton J.L, Hedman K and Remington J.S. (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.
- Liesenfeld O, Montoya J.G, Kinney S, Press C and Remington J.S. (2001). Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. J Infect Dis 183(8), 1248-53.
- Lin M.H, Chen T.C, Kuo T.T, Tseng C.C and Tseng C.P. (2000). Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 38(11), 4121-5.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. (1990). Use of uracile DNA glycosylase of control carry-over contamination in polymerase chain reaction. Gene 93, 125-128.
- Manialis T, Fristch E.F, Sambrook J. (1989). Molecular cloning : a laboratory manuel 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mantero G, Zonaro A, Albertini A, Bertolo P and Primi D. (1991) DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. Clin Chem 37(3), 422-9.
- Martell M, Gomez J, Esteban J.I, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R and Guardia J. (1999). High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. J Clin Microbiol 37(2), 327-32.
- Marty P, Le Fichoux Y, Deville A, Forest H. (1991). Toxoplasmose congénitale et toxoplasmose ganglionnaire maternelle périconceptionnelle. Presse Med 20(8), 387.
- Marty P, Bongain A, Rahal A, Thulliez P, Wasfi D, Lambert J.C, Le Fichoux,Y and Gillet J.Y. (1994). Prenatal diagnosis of severe fetal toxoplasmosis as a result of toxoplasmic reactivation in an HIV-1 seropositive woman. Prenat Diagn 14(5), 414-5.

- Maxam A.M, Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA 74, 560-564.
- McAuley J, Boyer K.M, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, Wolters C, Stein L, Stein M, Schey W. (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.
- Morin O. (2002). Diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale. Apport des nouvelles techniques de diagnostic. Immuno-analyse et Biologie spécialisée 17, 231-237.
- Morrison C, Gannon F. (1994). The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. Biochim Biophys Acta 1219, 493-8.
- Mullis K.B, Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155, 335-50.
- Naessens, A., Jenum, P.A., Pollak, A., Decoster, A., Lappalainen, M., Villena, I., Lebech, M., Stray-Pedersen, B., Hayde, M., Pinon, J.M., Petersen, E. and Foulon, W. (1999). Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation. J Pediatr 135(6), 714-9.
- Najioullah F, Thouvenot D and Lina B. (2001). Development of a real-time PCR procedure including an internal control for the measurement of HCMV viral load. J Virol Methods 92(1), 55-64.
- Nasarabadi S, Milanovich F, Richards J and Belgrader P. (1999). Simultaneous detection of TaqMan probes containing Fam and Tamra reporter fluorophores. Biotechniques 27(6), 1116-8.
- Nichols B.A, Chiappino M.L and O'Connor G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. J Ultrastruct Res 83, 85-98.
- Nicolas J.A, Pestre-Alexandre M. (1993). Toxoplasmose : une zoonose transmissible à l'homme. Med Mal Infect 23 spécial, 129-138.
- Nicolle C, Manceaux L. (1908). Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. C R Acad Sci (Paris) 147, 763-6.
- Nicolle C, Manceaux L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondii : toxoplasme. Arch Inst Pasteur Tunis 2, 97-103.
- Nitsche A, Steuer N, Schmidt C.A, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G and Siegert W. (2000). Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. J Clin Microbiol 38(7), 2734-7.

- Nucera E, Roncallo C, Masini L, Buonomo A, De Pasquale T, Pollastrini E, Schiavino D and Patriarca G. (2002). Successful tolerance induction to spiramycin in pregnancy. *Scand J Infect Dis* 34(7), 550-1.
- Ota N, Hirano K. (1998). "Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 26(3), 735-43.
- Pas S.D, Fries E, De Man R.A, Osterhaus A.D and Niesters H.G. (2000). Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol* 38(8), 2897-901.
- Paugam A. (1999). Applications de la biologie moléculaire au diagnostic de la toxoplasmose et autres protozooses. *RFL* 315, 49-52.
- Pelloux H., Guy E, Angelici M.C, Aspöck H, Bessières M.H, Blatz R, Del Pezzo M, Girault V, Gratzl R, Holberg-Petersen M, Johnson J, Kruger D, Lappalainen M. Naessens A and Olsson M. (1998). A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiol Lett* 165(2), 231-7.
- Pettersen E.K. (1979). Destruction of *Toxoplasma gondii* by HCl solution. *Acta Pathol Microbiol. Scand Sect B* 87,217-220.
- Peyron F, Wallon M and Bernardoux C. (1996). Long-term follow-up of patients with congenital ocular toxoplasmosis. *N Engl J Med* 334(15), 993-4.
- Pinon J.M, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A., Villaume M, Foudrinier F and Lèpan H. (1990). Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 28(8), 1739-43.
- Pinon J.M., Chemla C., Villena I., Foudrinier F., Aubert D., Puygauthier-Toubas D., Leroux B., Dupouy D., Quereux C., Talmud M., Trenque T., Potron G., Pluot M., Remy G. and Bonhomme A. (1996). Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J Clin Microbiol* 34(3), 579-83.
- Pinon J.M., Dumon H., Chemla C., Franck J., Petersen E., Lebech M., Zufferey J., Bessières M.H., Marty P., Holliman R., Johnson J., Luyasu V., Lecolier B., Guy E., Joynson D.H., Decoster A., Enders G., Pelloux H. and Candolfi E. (2001). Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol* 39(6), 2267-71.

- Pratlong F, Boulot P, Villena I, Issert E, Tamby I, Cazenave J and Dedet J.P. (1996). Antenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of the biological parameters in a cohort of 286 patients. *Br J Obstet Gynaecol* 103(6), 552-7.
- Prince J.B, Araujo F.G, Remington J.S, Burg J.L, Boothroyd J.D, Stharma S.D. (1989). Cloning of cDNA encoding a 28 kilodaltons antigen of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 34, 3-14.
- Prince J.B, Auer K.L, Huskinson J, Parmley S.F, Araujo F.G, Remington J.S. (1990). Cloning, expression and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 43, 97-106.
- Puech F, Guionnet B, Vaast P, Valat-Rigot A.S, Codaccioni X. (1996). Toxoplasmose et grossesse. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Gynécologie-Obstétrique* 5039-D-10, 6p.
- Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P and Costa J.M. (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(1), 7.
- Robert-Gangneux F, Ouatas T, Blanche P, Tourte-Schaefer C, Sicard D, Dupouy-Camet J. (1996). Evaluation rétrospective de la détection de *Toxoplasma gondii* par polymerase chain reaction chez des patients sidéens. *Presse médicale* 25, 541-545.
- Robert-Gangneux F, Vieljeuf C, Tourtre-Schaeffer C, Dupouy-Camet J. (1998). Apport de l'avidité des anticorps dans la datation d'une séroconversion toxoplasmique. *Ann Biol Clin* 56 n°5, 586-9.
- Robert-Gangneux F, Gavinet M.F, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaefer C and Dupouy-Camet J. (1999a). Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *J Clin Microbiol* 37(9), 2893-8.
- Robert-Gangneux F, Commerce V, Tourte-Schaefer C and Dupouy-Camet J. (1999b). 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, Kiffer F. (2001). Prise en charge diagnostic et thérapeutique de la toxoplasmose congénitale. *La lettre de l'infectiologue*, Tome XVI n°5.
- Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F and Dumon H. (2001). Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* 97(2), 296-300.

- Ryncarz A.J, Goddard J, Wald A, Huang M.L, Roizman B and Corey L. (1999). Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 37(6), 1941-7.
- Sabin A.B. (1942). Toxoplasmosis a recently recognized disease of human beings. *Adv Pediat* 1, 1.
- Sabin A.B, Feldman H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108, 660-663.
- Saffer L.D, Mercareau-Puijalon O, Dubrematz J.F, and Schwartzman J.D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool* 39, 526-530.
- Sakrauski A., Weber B, Kessler H.H, Pierer K and Doerr H.W. (1994). Comparison of two hybridization assays for the rapid detection of PCR amplified HSV genome sequences from cerebrospinal fluid. *J Virol Methods* 50(1-3), 175-84.
- Sambrook J, Russel D.W. (2001). *In vitro* amplification DNA by PCR: molecular cloning: a laboratory manual 3rd ed, vol 2, chap 8, 94-95. CSHL Press.
- Savva D, Morris J.C, Johnson J.D and Holliman R.E. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol* 32(1), 25-31.
- Schoondermark-Van de Ven E., Galama J, Camps W, Vree T, Russel F, Meuwissen J. and Melchers, W. (1994a). Pharmacokinetics of spiramycin in the rhesus monkey: transplacental passage and distribution in tissue in the fetus. *Antimicrob Agents Chemother* 38(9), 1922-9.
- Schoondermark-Van de Ven E, Melchers W, Camps W, Eskes T, Meuwissen J and Galama, J. (1994b). Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 38(9), 1930-6.
- Schoondermark-van de Ven E, Galama J, Vree T, Camps W, Baars I, Eskes T, Meuwissen J and Melchers W. (1995). Study of treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys with pyrimethamine and sulfadiazine. *Antimicrob Agents Chemother* 39(1), 137-44.
- Schutten M, van den Hoogen B, van der Ende M.E, Gruters R.A, Osterhaus A.D and Niesters H.G. (2000). Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma. *J Virol Methods* 88(1), 81-7.
- Schwartzman J.D, Krug E.C, Binder L.J, Payne M.R. (1985). Detection of the microtubule cytoskeleton of the coccidian *Toxoplasma gondii* and the hemoflagellate *Leishmania donovani* by monoclonal antibodies specific for beta-tubuline. *Journal of Protozoology* 32, 747-749.

- Sheffield H.G, Melton M.L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 54, 209-226.
- Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O and Bobic B. (1990). Onset of ocular complications in congenital toxoplasmosis associated with immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 9(9), 671-4.
- Sibley D, Boothroyd J.C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii*. Molecular and Biochemical Parasitology 51, 291-300.
- Thuilliez P. (1993). Toxoplasmose et grossesse. Med Mal Infect 23 spécial, 170-175.
- Tse C, Capeau J. (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin 61, 279-293.
- Tyagi S, Kramer F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol 14, 303-8.
- Verhofstede C, Reniers S, Colebunders R, Van Wanseele F, Plum J. (1993). Polymerase chain reaction in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis. AIDS 7, 1539-1541.
- Villena I, Aubert D, Leroux B, Dupouy D, Talmud M, Chemla C, Trenque T, Schmit G, Quereux C, Guenounou M, Pluot M, Bonhomme A and Pinon J.M. (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.
- Wallon M, Mallaret M.R, Mojon M, Peyron F. (1994). Toxoplasmose congénitale, une évaluation de la politique de prévention. Presse Med 23, 1467-1470.
- Wallon M, Cozon G, Ecochard R, Lewin P and Peyron F. (2001). Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. Eur J Pediatr 160(9), 534-40.
- Weiss L.M, Udem S.A, Salgo M, Tanowitz H.B and Wittner M. (1991). Sensitive and specific detection of *Toxoplasma* DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. J Infect Dis 163(1), 180-6.
- Wittwer C.T, Herrmann M.G, Moss A.A, Rasmussen R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 22, 130-8.
- Wolf A, Manceaux L. (1937) Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephaliozic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. Bull Neurol Inst N Y 6, 306.

- Wong S.Y, Hajdu M.P, Ramirez R, Thulliez P, McLeod R and Remington J.S. (1993). Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. J Clin Microbiol 31(11), 2952-9.
- Zenner L, Darcy F, Cesbron-Delauw M.F and Capron A. (1993). Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. Infect Immun 61(1), 360-3.
- Zuber P, Jacquier P. (1995). Epidémiologie de la toxoplasmose : situation au niveau mondial. Schweiz Med Wochenschr 125 suppl 65, 195-225.
- Zylberberg H, Robert F, Le Gal FA, Dupouy-Camet J, Zylberberg L, Viard JP. (1995). Prolonged isolated fever due to attenuated extracerebral toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus who are receiving trimethoprim-sulfamethoxazole as prophylaxis. Clinical Infectious Diseases 21, 680-681.