

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2018

N° 2018-177

Thèse pour le
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE
DES de BIOLOGIE MEDICALE
Soutenu devant le Jury Interrégional
Le 23/10/2018
Par Coralie GUYONNAUD

Mise au point d'une approche par biologie
moléculaire pour la détection de
Toxoplasma gondii à partir de placentadans l'aide
au diagnostic de la toxoplasmose congénitale

Directeur de thèse

Madame le Docteur Rose-Anne LAVERGNE, PHU en Parasitologie-Mycologie

Président du Jury

Mr le Professeur Didier LEPELLETIER, PUPH en Bactériologie, Virologie, Hygiène
Hospitalière

Membres du Jury

Mr le Professeur Patrice LEPAPE, PUPH en Parasitologie- Mycologie

Mme le Docteur Elise LAUNAY, MCU-PH en Pédiatrie

Mr le Docteur Bernard CIMON, PH en Parasitologie- Mycologie

REMERCIEMENTS

Au président du jury,
Monsieur le Professeur Didier LEPELLETIER,
Vous me faites l'honneur de présider ce jury.

A ma directrice de thèse,
Madame le Docteur Rose-Anne LAVERGNE,
Tu m'as proposé ce travail en me faisant bénéficier de ton savoir et de ton expérience. Je tiens à t'exprimer mes sincères remerciements pour ta disponibilité, tes remarques pertinentes, tes conseils et ton soutien tout au long de ce travail.

A mes membres du jury,

Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE,
Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Madame le Docteur Elise LAUNAY,
Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Bernard CIMON,
Vous me faites l'honneur de faire partie de ce jury.

Veillez recevoir mes plus sincères remerciements.

A la société PROMEGA et en particulier à Mr FABLET,
Veillez recevoir mes sincères remerciements pour votre soutien technique.

A ma famille,

A mon Papa, qui aurait été si fier.

A ma Maman, ton inconditionnel soutien m'a permis d'en arriver là aujourd'hui.

A mes petites sœurs Eva et Chloé qui forcent mon admiration.

A Stéphanie, Dominique et mes trois neveux, Sacha, Gabriel et Louis.

A mes grands-parents, qui auraient tant aimé être présents.

A mes oncles et tantes, cousins et cousines.

A ma marraine Sylvie et à mon parrain Patrick.

A mes amis,

A Mika, tu as toujours été d'un rare soutien.

A Manue, pour tous nos bons moments partagés.

A Emilie, Laure, Pauline et Nelly, mes amies d'enfance, j'ai énormément d'estime pour vous.

A la Team Peacock, Margot, Caro, Yoann et Alizée, pour tous les moments inoubliables, vous êtes très importants pour moi.

A la Salsa Team, notamment Laura, Ludo et Camille, pour votre bonne humeur, votre gentillesse, votre humour, je passe toujours des bons moments à vos côtés.

A Florian et Gala, grâce à qui j'ai d'excellents souvenirs des bancs de la fac, aux nombreux fous rires partagés.

A Céline, tu as toujours été d'un soutien sans faille.

A mes co-internes nantais,

A Mathilde, Emilie, Julie et Maryam.

A Sally et Marc, mes biologistes bretons préférés.

A Adeline, pour toutes nos rigolades sur les « souches virulentes ».

A Alix et Camille, pour nos folles séances d'aquabike.

A Claire, je suis ravie que tu prennes la suite de mon projet de thèse; merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

A Aurélie et Emeline, j'ai passé un super semestre d'immunologie en votre compagnie, que de bons souvenirs.

A Clémence, ta bonne humeur constante est communicative.

A mes co-internes d'hémato, Marion, Julian, Sophie, Robin, Alizée et Alexandre sans qui ce semestre n'aurait pas été aussi amusant.

A tous les autres co-internes dont j'ai croisé la route pendant ces quatre années d'internat nantais.

Aux bonnes rencontres du travail,

Aux techniciennes du laboratoire de parasitologie, pour leur bonne humeur et leur aide précieuse pour les manipulations de thèse.

A l'équipe d'immuno-hématologie de l'EFS de Nantes, grâce à qui j'ai passé un semestre inoubliable.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION.....	15
1 ^{ère} partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. LE PARASITE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	17
1. Taxonomie.....	17
2. Formes parasitaires.....	17
2.1. Tachyzoïte	17
2.2. Bradyzoïte.....	18
2.3. Sporozoïtes	19
3. Cycle biologique.....	20
3.1. Cycle chez l'hôte définitif	20
3.2. Cycle chez l'hôte intermédiaire	21
4. Génotypes	23
II. LA TOXOPLASMOSE HUMAINE	24
1. Modes de contamination.....	24
1.1. A partir de kystes.....	24
1.2. A partir d'oocystes.....	24
1.3. A partir de tachyzoïtes.....	24
2. Epidémiologie : séroprévalence en France	25
3. Aspects cliniques	26
3.1. Formes chez l'immunocompétent.....	26
3.2. Formes chez l'immunodéprimé	26
4. Diagnostic.....	28
4.1. Diagnostic sérologique : cinétique et mise en évidence des anticorps	28
4.1.1. Cinétique des anticorps.....	28
4.1.2. Le Dye Test	29
4.1.3. Techniques immuno-enzymatiques : détection des IgG, IgM et IgA	29
4.1.4. Test immunochromatographique	30

4.1.5.	Techniques complémentaires.....	31
4.1.5.1.	ISAGA (Immuno-Sorbent AGglutination Assay)	31
4.1.5.2.	Test d'avidité des IgG par technique ELISA modifiée.....	32
4.1.5.3.	Western Blot	33
4.1.6.	Autres techniques	34
4.1.6.1.	L'immunofluorescence indirecte (IFI)	34
4.1.6.2.	Agglutination directe	35
4.1.6.3.	Agglutination directe sensibilisée.....	35
4.1.6.4.	Agglutination indirecte	35
4.2.	Diagnostic direct : recherche du parasite ou de son ADN.....	35
4.2.1.	Coloration au MGG.....	35
4.2.2.	PCR en temps réel	36
4.2.3.	Inoculation à la souris.....	36
III.	L'INFECTION A <i>TOXOPLASMA GONDII</i> CHEZ LA FEMME ENCEINTE	37
1.	Incidence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes.....	37
2.	Prévention primaire de l'infection toxoplasmique : mesures hygiéno-diététiques.....	37
3.	Réglementation en France : suivi sérologique mensuel	38
4.	Interprétation des profils sérologiques de la femme enceinte et conduite à tenir.....	38
4.1.	Absence d'IgG et d'IgM.....	39
4.2.	Présence d'IgM et absence IgG	40
4.4.	Présence d'IgG et absence d'IgM.....	44
4.5.	Présence d'IgG à un taux équivoque et absence d'IgM.....	46
IV.	LA TOXOPLASMOSE CONGÉNITALE.....	48
1.	Définition.....	48
2.	Transmission materno-foetale	48
3.	Epidémiologie.....	50
4.	Lésions cliniques	51
4.1.	Stades de gravité.....	51
4.2.	Lésions chorioretiniennes	52
4.3.	Lésions neurologiques	53
5.	Diagnostic de la toxoplasmose congénitale.....	53
5.1.	Diagnostic prénatal	53
5.1.1.	Diagnostic prénatal biologique (DPN)	53

5.1.2.	Diagnostic prénatal par imagerie	55
5.2.	Diagnostic néonatal (DNN)	56
5.2.1.	Etude sérologique	56
5.2.2.	Mise en évidence du toxoplasme	57
5.3.	Diagnostic post-natal	58
6.	Données épidémiologiques pronostiques	59
6.1.	Létalité.....	59
6.2.	Morbidité	59
6.3.	Pronostic visuel.....	60
7.	Traitement.....	62
7.1.	Médicaments utilisés	62
7.2.	Traitement de la femme enceinte.....	62
7.3.	Prise en charge du nouveau-né et suivi.....	63
2 ^{ème} partie :	ETUDE EXPERIMENTALE.....	64
	INTRODUCTION.....	65
I.	Echantillons et méthodes.....	65
1.	Placentas	65
2.	Inoculation à la souris.....	66
3.	Extraction	66
3.1.	Présentation de l'extracteur	66
3.2.	Principe de l'extraction.....	67
4.	PCR.....	68
4.1.	Principe de la PCR temps réel	68
4.2.	Kit de détection de <i>T. gondii</i>	71
4.2.1.	Détection de <i>Toxoplasma gondii</i>	72
4.2.2.	Détection des inhibiteurs de PCR.....	72
4.2.3.	Interprétation des résultats.....	72
4.3.	PCR Albumine.....	73
II.	Résultats	74
1.	Mise au point de la technique d'extraction.....	74
1.1.	Choix du kit	74
1.2.	Volume d'échantillon à extraire	78
1.3.	Prétraitement de l'échantillon.....	79

1.4.	Choix du tampon de lyse	80
1.5.	Ajout de billes en verre stériles	81
1.6.	Protocole définitif.....	83
2.	Application de la technique aux échantillons de placenta	85
III.	DISCUSSION.....	90
IV.	CONCLUSION	94
	BIBLIOGRAPHIE	95
	ANNEXES	104

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Classification taxonomique de <i>T. gondii</i>	17
Figure 2: Tachyzoïtes de <i>T. gondii</i>	18
Figure 3: Ultrastructure du tachyzoïte de <i>T. gondii</i>	18
Figure 4: Vue microscopique (après coloration au Giemsa) d'un kyste de <i>T. gondii</i> sur un frottis de moelle.	19
Figure 5: Oocystes de toxoplasme	20
Figure 6: Cycle de <i>T. gondii</i> chez l'hôte définitif et l'hôte intermédiaire	22
Figure 7: Évolution de la séroprévalence régionale de la toxoplasmose évaluée en pourcentage chez les femmes enceintes entre 1995 et 2010	25
Figure 8: Abscès cérébral toxoplasmique chez un sujet immunodéprimé.	27
Figure 9: Chorioretinite toxoplasmique.....	27
Figure 10: Cinétique d'apparition des anticorps anti-toxoplasme.	28
Figure 11: Principe de la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays).....	29
Figure 12: Test <i>Toxoplasma</i> ICT IgG-IgM.	31
Figure 13: Test <i>Toxoplasma</i> ISAGA -IgM ou IgA.....	32
Figure 14 : Test Western Blot avec le kit LDBio Toxo II IgG.....	34
Figure 15: Cinétique d'apparition des IgG et des IgM après contamination par <i>T. gondii</i>	39
Figure 16: Sérologie toxoplasmique avec absence d'IgG et d'IgM	39
Figure 17: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM et des IgG négatives »	40
Figure 18: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgM et absence IgG	40
Figure 19: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM positives et des IgG négatives »	41
Figure 20: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgG et d'IgM	42
Figure 21: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM et des IgG positives »	43
Figure 22: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgG et absence d'IgM.	44
Figure 23: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM négatives et des IgG positives »	45
Figure 24: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgG à un taux équivoque et absence d'IgM	46
Figure 25: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM négatives et des IgG équivoques »	47
Figure 26: Risque de transmission et gravité de la toxoplasmose congénitale en fonction du terme de la grossesse.	49

Figure 27: Nombre de cas de TC diagnostiqués en France entre le 1er Janvier et le 31 décembre 2016 en fonction du trimestre de la grossesse n=(192).....	49
Figure 28: Nombre de cas de TC diagnostiqués en France pour 1000 naissances du 1er Janvier au 31 décembre 2016 selon l'âge des femmes	50
Figure 29 : Distribution régionale du nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France du 1er Janvier au 31 décembre 2016 pour 1000 naissances	51
Figure 30: Lésions de chorioretinite chez des patients atteints de toxoplasmose congénitale	52
Figure 31: « Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale »	54
Figure 32: « Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale »	55
Figure 33 : Profils immunologiques comparés sang maternel/sang du nouveau-né par la technique Western Blot pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale	57
Figure 34: « Effectif des cas de TC diagnostiqués en France entre le 1er janvier et le 31 décembre 2016». .	58
Figure 35: Automate Maxwell® RSC	67
Figure 36: Principe de fonctionnement de l'extracteur Maxwell® RSC : un barreau magnétique recouvert d'une gaine en plastique déplace les particules paramagnétiques de puit en puit	68
Figure 37: Les différentes étapes de la PCR	69
Figure 38: Principe de l'émission de fluorescence par la sonde Taqman	70
Figure 39: « Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles »	70
Figure 40: Fonctionnement du système optique du Rotor-Gene Q (Rotor-Gene Q User Manual)	71
Figure 41: Protocole définitif de pré-traitement des échantillons.	84
Figure 42: Résultats de la PCR <i>Toxoplasma</i> des 93 échantillons de placentas.	89

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Mortalité parmi les cas de toxoplasmose congénitale entre 2007 et 2016	59
Tableau 2: Morbidité liée à la TC entre 2007 et 2016	60
Tableau 3: Cas de chorioretinites à la naissance parmi les cas de TC à la naissance entre 2010 et 2016.....	61
Tableau 4: Contenu du Kit de PCR <i>T. gondii</i> Bio-Evolution	71
Tableau 5: Cycles de température dans le thermocycleur pour la PCR <i>Toxoplasma</i>	72
Tableau 6: Les séquences des amorces et de la sonde Taqman utilisées pour la PCR albumine	73
Tableau 7: Protocoles de préparation des échantillons.....	74
Tableau 8: Paramètres des extractions réalisées avec les kits RSC Blood DNA et RSC Cultured Cells DNA.	75
Tableau 9: Tableau récapitulatif des paramètres des 22 extractions d'ADN réalisées avec les kits RSC Blood DNA et RSC Cultured Cells DNA et résultats des PCR <i>Toxoplasma</i>	76
Tableau 10: Paramètres des protocoles réalisés avec le kit RSC Pure Food Pathogen.	77
Tableau 11: Résultats des PCR toxoplasmose et Ct inhibiteurs avec l'utilisation du kit RSC Pure Food Pathogen.	77
Tableau 12: Contenu du Kit RSC Blood Maxwell®	78
Tableau 13: Tableau récapitulatif des volumes de placentas extraits, de la quantité d'ADN extraite et résultats des PCR toxoplasma avec le kit RSC Blood DNA.	78
Tableau 14: Paramètres des essais d'ajustement des quantités de réactifs du kit RSC Blood DNA.....	79
Tableau 15: Résultats des PCR <i>Toxoplasma</i> et Ct inhibiteurs.	80
Tableau 16: Paramètres des essais avec les tampons de lyse TLA et CLD et résultats des PCR <i>Toxoplasma</i>	81
Tableau 17: Paramètres des essais avec les tampons de lyse TLA et CLD et résultats des PCR <i>Toxoplasma</i>	82
Tableau 18: Résultats des PCR Albumine et <i>Toxoplasma</i> des 93 échantillons de placentas et comparaison avec le résultat de l'inoculation.	88
Tableau 19: Résultats des PCR <i>Toxoplasma</i> des 5 échantillons de placentas discordants entre l'inoculation à la souris et la PCR <i>Toxoplasma</i>	88
Tableau 20: Tableau récapitulatif des résultats de l'inoculation et de la PCR <i>Toxoplasma</i> des 93 échantillons de placentas étudiés.	89

LISTE DES ABREVIATIONS

AAN : Anticorps Anti Nucléaires
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CNR : Centre National de Référence
Ct : Cycle threshold
DHFR : DiHydroFolate Réductase
DHPS : *DiHydroPtérote Synthétase*
DM : Donnée Manquante
DNN : Diagnostic Néonatal
dNTPs : désoxyriboNucléotides TriPhosphates
DO : Densité Optique
DOM : Département d'Outre-Mer
DPN : Diagnostic PréNatal
EIA : Enzyme ImmunoAssays
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HAS : Haute Autorité de Santé
IFI : ImmunoFluorescence Indirecte
Ig : Immunoglobuline
IMG : Interruption Médicale de Grossesse
IVG : Interruption Volontaire de Grossesse
ISAGA : Immuno-Sorbent Agglutination Assay
kDa : kiloDalton
LBA : Liquide Broncho-Alvéolaire
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
MFIU : Mort Fœtale In Utero
MGG : May Grunwald Giemsa
PCR : Polymerase Chain Reaction
PK : Protéinase K
SA : Semaine d'Aménorrhée
TC : Toxoplasmosse Congénitale
TLA : Tissue Lysis Buffer
UV : UltraViolet
VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

La toxoplasmose est une parasitose cosmopolite causée par un parasite protozoaire appartenant à la famille des coccidies, nommé *Toxoplasma gondii*. Cette pathologie, majoritairement bénigne chez un sujet immunocompétent, peut s'avérer dangereuse chez les femmes enceintes à cause du risque d'atteinte fœtale et est très grave chez les sujets immunodéprimés. La transmission transplacentaire du parasite survient en moyenne dans 30% des cas de séroconversion maternelle lors de la grossesse (1), pouvant entraîner des lésions cérébrales et/ou oculaires du fœtus et pouvant aller jusqu'à la mort fœtale *in utero*. *Toxoplasma gondii* est donc un agent infectieux responsable d'infection congénitale avec 192 cas de toxoplasmose congénitale déclarés en France pour l'année 2016(2). En France, un programme de prévention de la toxoplasmose congénitale a été mis en place à la fin des années 1970 chez les femmes enceintes et repose sur le dépistage sérologique de toutes les femmes enceintes en début de grossesse et le suivi sérologique mensuel associé au respect de règles hygiéno-diététiques pour celles séronégatives.

Le diagnostic de cette infection congénitale est envisagé dès lors qu'une séroconversion maternelle a été mise en évidence et celui-ci doit être précoce pour permettre la prise en charge la plus rapide possible du fœtus puis du nouveau-né. Le diagnostic biologique de toxoplasmose congénitale repose en période prénatale sur l'analyse du liquide amniotique puis en période néonatale sur la recherche de *T. gondii* sur placenta et sang de cordon ainsi que sur des analyses sérologiques du nouveau-né.

Actuellement au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes, la technique de détection de *T. gondii* dans le placenta consiste à inoculer un extrait de placenta à des souris et à réaliser une surveillance sérologique de ces dernières ; cependant, une recherche directe de l'ADN parasitaire sur placenta par une technique de PCR pourrait constituer une avancée technologique dans l'aide au diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

Après une revue bibliographique des données actuelles sur cette infection et sur les techniques de diagnostic de la toxoplasmose, l'objectif de ce travail de thèse est de mettre au point une technique de biologie moléculaire pour détecter *T. gondii* à partir de placenta pour aider au diagnostic de toxoplasmose congénitale au sein du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes.

1^{ère} partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE PARASITE *TOXOPLASMA GONDII*

1. Taxonomie

Toxoplasma gondii est un protozoaire à développement intracellulaire obligatoire qui appartient au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des Coccidies, à la famille des *Sarcocystidae* et au genre *Toxoplasma* comportant uniquement *T. gondii*(3) (Figure 1).

Kingdom	Protista
Sub kingdom	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Class	Conoidasida
Order	Eucoccidiorida
Sub order	Eimeriorina
Family	Sarcocystidae
Sub family	Toxoplasmatinae
Genus	Toxoplasma
Species	<i>Toxoplasma gondii</i>

Figure 1: Classification taxonomique de *T. gondii*(4).

2. Formes parasitaires

Toxoplasma gondii se présente sous 3 formes différentes au cours de son cycle : le tachyzoïte, le bradyzoïte et le sporozoïte.

2.1. Tachyzoïte

C'est la forme invasive à division rapide qui prolifère dans les cellules macrophagiques. Le tachyzoïte est la seule forme capable de traverser la barrière placentaire. Il a une forme courbée et mesure 6 à 8µm de longueur sur 3 à 4µm de largeur (5) (Figure 2). L'extrémité antérieure est effilée alors que l'extrémité postérieure est plus large et arrondie; à l'extrémité antérieure se trouve le complexe apical, caractéristique des *Apicomplexa*, comprenant les rhoptries, le conoïde, le micronème et les granules denses (Figure 3) et permettant l'invasion du parasite dans la cellule hôte (6).

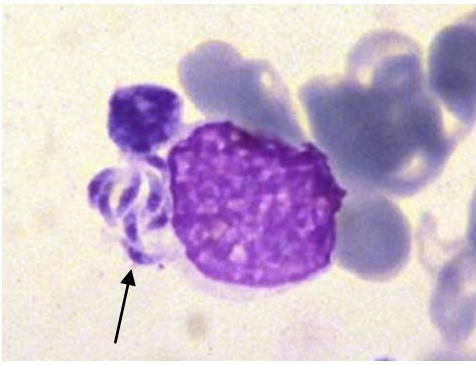


Figure 2: Tachyzoïtes de *T. gondii*(5).

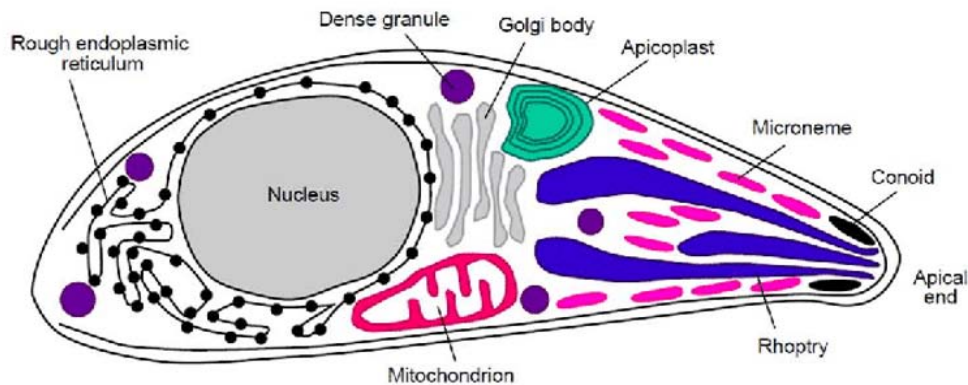


Figure 3: Ultrastructure du tachyzoïte de *T. gondii*(7).

Rough endoplasmic reticulum : réticulum endoplasmique rugueux ; Dense granule : granule dense ; Golgi body : appareil de Golgi ; Apicoplast : complexe apical ; Microneme : micronème, Conoid : conoïde, Apical end : extrémité antérieure ; Rhoptry : rhoptrie ; Mitochondrion : mitochondrie

Le tachyzoïte se multiplie par un processus d'endodyogénie c'est-à-dire par une reproduction asexuée dans laquelle une cellule mère se divise en deux cellules filles. Il provoque alors des lésions nécrotiques des tissus dans lesquels il se développe. Chez la femme enceinte, il peut atteindre le fœtus après multiplication au niveau du placenta. Cette forme végétative, très fragile dans le milieu extérieur, est détruite par l'acidité gastrique ce qui explique qu'elle n'est pas contaminante par voie orale (8).

2.2. Bradyzoïte

Le bradyzoïte résulte du stade tachyzoïte au cours de son évolution. Il se distingue du tachyzoïte par un métabolisme ralenti conduisant à un état de latence. Les bradyzoïtes sont regroupés au sein de kystes ce qui les rend inaccessibles aux défenses immunitaires et aux traitements actuels. Les bradyzoïtes intrakystiques sont la forme de résistance du parasite dans l'organisme. Un kyste

mesure 50 à 200 μm et contient plusieurs centaines de bradyzoïtes (Figure 4). Les kystes siègent principalement au niveau des muscles, du cerveau et de la rétine (9) et ils permettent la production d'anticorps protecteurs en libérant des antigènes, ce qui entretient l'immunité protectrice envers *T. gondii* (10). Les bradyzoïtes sont résistants à l'acidité gastrique (8) mais sont détruits par des températures extrêmes, notamment par une cuisson à plus de 67°C et par une congélation de plus de 24 heures à -20°C; cependant ils demeurent toujours infectants malgré une exposition de plusieurs semaines à 4°C (11).

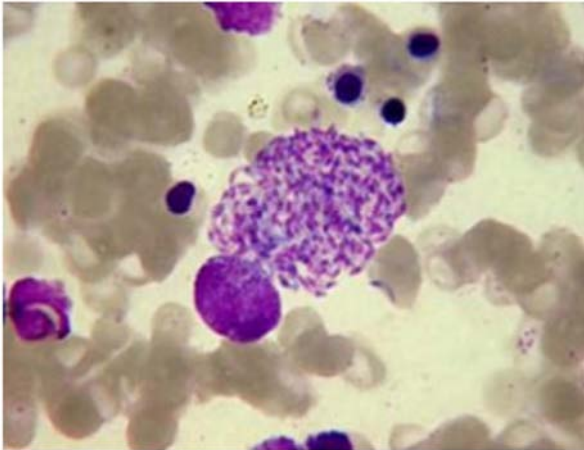


Figure 4: Vue microscopique (après coloration au Giemsa) d'un kyste de *T. gondii* sur un frottis de moelle(5).

2.3. Sporozoïtes

Les oocystes, de forme ovoïde et mesurant 11 à 12 μm de diamètre, contiennent les sporozoïtes ; il s'agit d'une forme de résistance dans le milieu extérieur. Ils sont issus de la reproduction sexuée à l'intérieur des cellules intestinales des félinés et sont éliminés non sporulés dans leurs déjections ; ils doivent alors subir une sporulation d'une durée de 1 à 5 jours pour devenir infectants. A l'intérieur d'un oocyste s'individualisent deux sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes(12) (Figure 5).

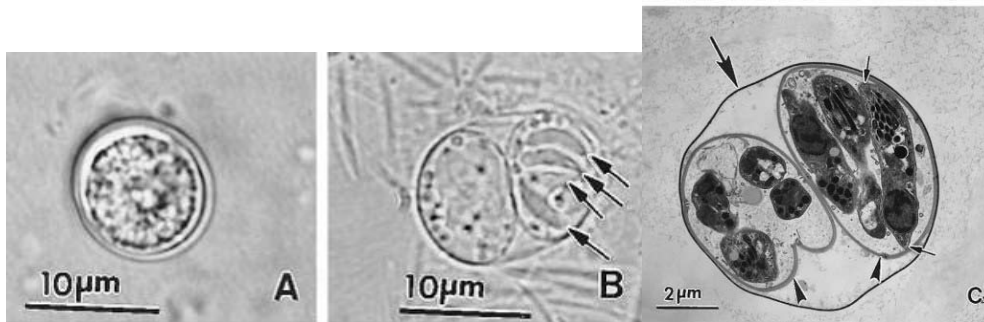


Figure 5: Oocystes de *T. gondii*(13).

(A) Oocyste non sporulé. (B) Oocyste sporulé avec deux sporocystes ; 4 sporozoïtes (flèches) sont visibles dans l'un des sporocystes. (C) Oocyste sporulé avec sa fine paroi (grande flèche), deux sporocystes (pointes de flèches) et les sporozoïtes (petites flèches).

La grande résistance de la paroi de l'oocyste permet au parasite de rester infestant au moins un an dans l'environnement dans des conditions de température et d'humidité favorables, de résister à une congélation jusqu'à -20°C , à l'acidité gastrique et à de nombreux agents désinfectants notamment l'eau de Javel (14). Par contre, ils sont détruits à de fortes températures ($>60^{\circ}\text{C}$) et sont sensibles à la dessiccation.

3. Cycle biologique

3.1. Cycle chez l'hôte définitif

Les hôtes définitifs de *T. gondii* sont les félinés et notamment les chats en France. Chez son hôte définitif, le parasite développe un cycle complet comprenant une phase asexuée et une phase sexuée dans lequel les 3 formes parasitaires sont retrouvées. Le chat se contamine principalement en ingérant des kystes contenus dans la chair de ses proies (rongeurs, oiseaux) mais également par ingestion d'oocystes matures contenus dans la terre et sur les végétaux. Les sporozoïtes contenus dans les oocystes ou les bradyzoïtes contenus dans les kystes évoluent rapidement en tachyzoïtes qui se différencient à leur tour en mérozoïtes puis se multiplient dans l'intestin du chat au niveau de l'iléon. La multiplication asexuée se déroule dans le tube digestif et dans les tissus extra-intestinaux avec circulation de tachyzoïtes et formation secondaire de kystes. Après quelques divisions cellulaires appelées schizogonies, les mérozoïtes contenus dans le tube digestif se différencient soit en microgamètes mâles soit en macrogamètes femelles et amorcent le cycle sexué (Figure 6). La fécondation des macrogamètes femelles par les microgamètes mâles aboutit à la formation d'oocystes immatures dans la lumière intestinale du chat qui sont ensuite excrétés non sporulés en

très grande quantité avec les déjections du chat (10). Les oocystes subissent une sporulation dans l'environnement par sporogonie, ce qui aboutit à la formation de 2 sporocystes, chacun contenant 4 sporozoïtes infectants. L'élimination des oocystes débute 3 à 10 jours après l'ingestion de kystes et plus de 18 jours après l'ingestion d'oocystes (12).

3.2. Cycle chez l'hôte intermédiaire

Toxoplasma gondii peut infecter tous les mammifères dont l'Homme, hôte intermédiaire chez lequel se déroule le cycle asexué aboutissant à la formation de bradyzoïtes contenus dans les kystes tissulaires. Chez les hôtes intermédiaires, la contamination se fait principalement par voie orale par ingestion de kystes vivants contenus dans la viande ou d'oocystes sporulés contenus dans l'eau et les aliments souillés. Les bradyzoïtes et/ou sporozoïtes sont libérés dans le tube digestif et se différencient en tachyzoïtes ayant un fort pouvoir de multiplication. Après pénétration dans les entérocytes, les tachyzoïtes disséminent par voie sanguine et lymphatique puis se multiplient dans les macrophages ce qui permet leur diffusion à tout l'organisme; ils finissent par former des kystes dans les tissus, particulièrement dans les muscles striés, l'œil et le cerveau(15). Si cette contamination a lieu pendant la grossesse, les tachyzoïtes peuvent traverser la barrière placentaire et ainsi infecter le fœtus. La dissémination des tachyzoïtes entraîne une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Les kystes apparaissent 10 à 15 jours après l'ingestion d'oocystes ou de kystes marquant ainsi le début de la phase chronique de la maladie; ces kystes persistent toute la vie de l'hôte et produisent des antigènes permettant d'entretenir une immunité non stérilisante mais protectrice contre toute nouvelle contamination et ce à condition que le sujet soit immunocompétent. Cependant, cette immunité protectrice ne semble pas totale puisque des cas de réinfections par des souches de génotype différent de la souche initiale sont décrites (16,17).

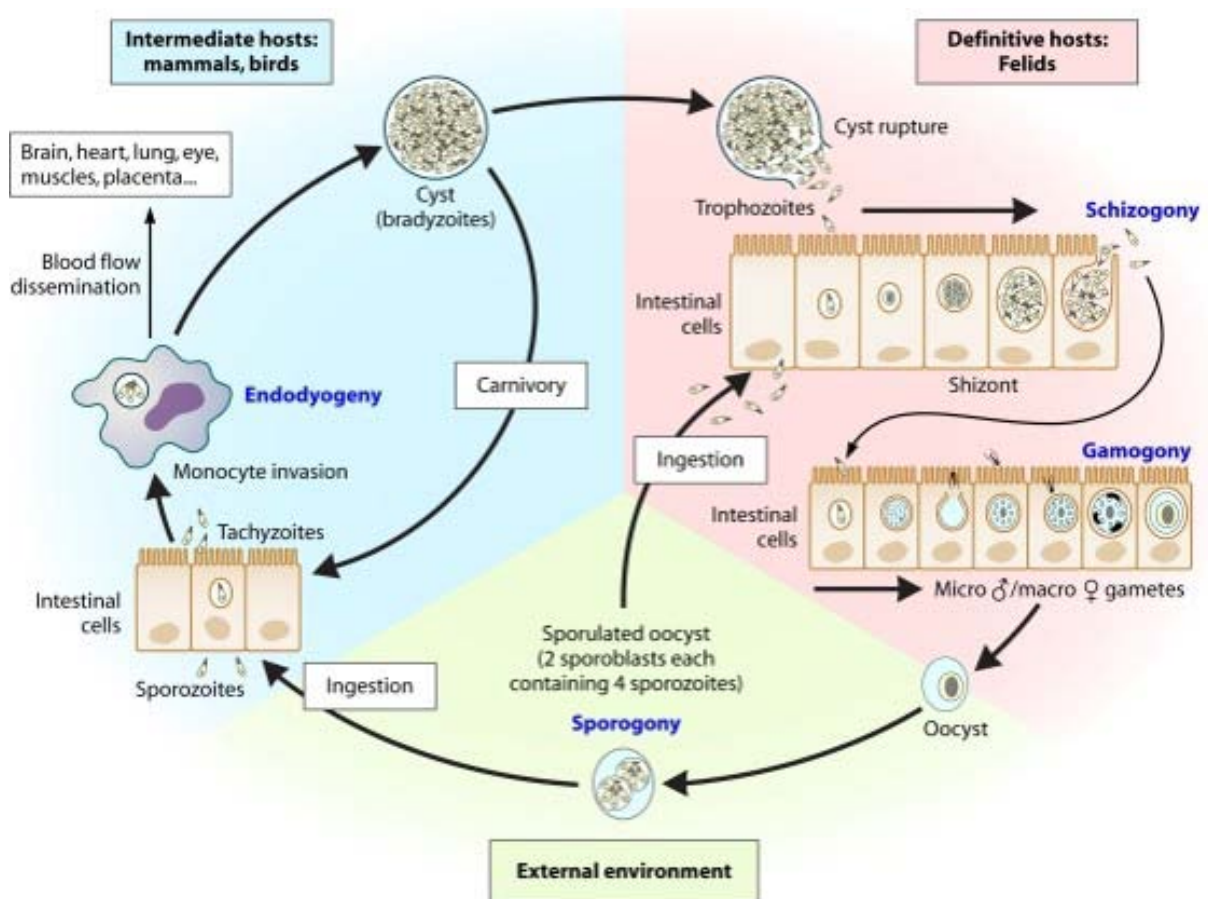


Figure 6: Cycle de *T. gondii* chez l'hôte définitif et l'hôte intermédiaire (10).

4. Génotypes

A l'heure actuelle, on distingue 3 principaux génotypes de *T. gondii* dont les différences concernent (18): la virulence de la souche (une souche est dite virulente si un tachyzoïte inoculé à une souris entraîne son décès dans les 10 jours), la capacité à traverser les barrières biologiques et la vitesse de multiplication en culture cellulaire. Chaque génotype de *T. gondii* possède donc ses caractéristiques biologiques.

Le génotype I est rarement isolé et a une origine principalement humaine ; il possède une virulence importante chez la souris et un fort potentiel de multiplication en culture cellulaire.

Le génotype II est d'origine humaine ou animale (réservoir domestique ou sauvage) et représente 80% des souches ; chez la souris il a un comportement non virulent se traduisant par une infection chronique avec persistance de kystes tissulaires et son taux de multiplication in vitro est faible.

Le génotype III, d'origine humaine ou animale, est très peu isolé et a une virulence intermédiaire entre les génotypes de type I et II.

Il existe des génotypes qui n'appartiennent pas aux génotypes classiques : le génotype *Africa 1* souvent observé dans des cas de réactivations de toxoplasmose cérébrale chez des patients séropositifs pour le VIH, le génotype *Caribbean*, proche du type III, ne présentant pas de caractère de pathogénicité particulier, a souvent été observé dans des cas de toxoplasmose congénitale asymptomatiques et le génotype *Amazonian* dont la présentation clinique est parfois particulière (toxoplasmose oculaire fébrile avec parasitémie lors d'une primo-infection).

Des génotypes dits atypiques ont également été mis en évidence et sont associés à une virulence importante : cas de toxoplasmose oculaire sévère suite à des réactivations dont un cas chez un patient immunocompétent rapporté en 2014, cas de toxoplasmoses congénitales avec plusieurs cas de morts fœtales *in utero*, et même un cas de toxoplasmose disséminée mortelle chez un patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques(19).

Tous ces génotypes peuvent infecter l'Homme mais on retrouve principalement le génotype II et ses variants en Europe et en France métropolitaine (20).

II. LA TOXOPLASMOSE HUMAINE

1. Modes de contamination

1.1. A partir de kystes

L'ingestion de viandes insuffisamment cuites pouvant contenir des kystes de *T. gondii* reste le principal mode de contamination en France. Cependant, le risque d'être contaminé diffère en fonction de la nature de la viande: il est élevé avec la consommation de viande de mouton et de boeuf insuffisamment cuite mais l'ingestion de viande de porc peu cuite n'est pas associée de manière significative à un risque de contamination (21). Des cas de contaminations liées à la consommation de viande de cheval importée d'Amérique du Sud ont été rapportés impliquant des souches de *T. gondii* particulièrement virulentes entraînant des toxoplasmoses sévères parfois même mortelles (22). Les kystes étant détruits par la chaleur et la congélation, l'augmentation de la consommation de viande congelée au préalable pourrait participer à la baisse de la séroprévalence observée chez les femmes en âge de procréer (11). L'absence de lavage des mains ou des ustensiles après manipulation de la viande crue est aussi une source potentielle de contamination à partir des kystes.

Lors de greffes d'organe solide et notamment de greffe cardiaque, il a été rapporté des cas de toxoplasmose chez les receveurs séronégatifs par primo-infection à partir des kystes toxoplasmiques contenus dans le greffon de donneurs séropositifs(23).

1.2. A partir d'oocystes

Cette contamination se fait par l'ingestion d'oocystes sporulés provenant de déjections de chats et présents sur des aliments souillés notamment les crudités, les salades, les fruits, les herbes aromatiques ou l'eau de boisson. Il existe également un risque de contamination via les oocystes lors de la manipulation de la litière de chat dans laquelle il y a eu sporulation de ces oocystes ou suite au jardinage; cependant, l'excrétion par le chat est transitoire et concerne essentiellement les jeunes chats (24).

1.3. A partir de tachyzoïtes

Après contamination d'une femme enceinte et diffusion par voie hématogène, le tachyzoïte peut contaminer le fœtus après colonisation placentaire et entraîner une atteinte multiviscérale (25). De très rares cas de transmissions de tachyzoïtes par l'intermédiaire de transfusion de produits sanguins labiles (26) et de consommation de lait de chèvre ont été rapportés (27).

2. Epidémiologie : séroprévalence en France

La toxoplasmose est l'une des infections les plus prévalentes en France, ainsi sa séroprévalence chez les adultes s'élève entre 20 et 55% selon les études. Depuis une cinquantaine d'années, on observe une diminution régulière de la séroprévalence toxoplasmique chez les femmes enceintes : en 1960, elle était estimée à 80% (28), 63,3% dans les débuts des années 1980 (29), 54,3% en 1995 (30), 43,8% en 2003(31) et 36,7% en 2010 (32). Cette décroissance s'explique par une meilleure hygiène et un conditionnement différent des aliments mais elle a pour conséquence une augmentation du nombre de femmes séronégatives qui devront être suivies mensuellement lors d'une éventuelle grossesse. Cette séroprévalence est variable en fonction des régions, ce qui s'explique par des différences climatiques et de consommations alimentaires (30,31)(Figure 7): la prévalence est élevée dans les DOM (54,8 %), en région parisienne (52,7%) et dans la région Sud-Ouest (50%) et faible dans le Nord-Est (29,5%). Elle augmente également avec l'âge des femmes enceintes : en 2010, 26,5% des femmes enceintes entre 20 et 25 ans étaient immunisées versus 48,4% chez celles de 35-40 ans (31).

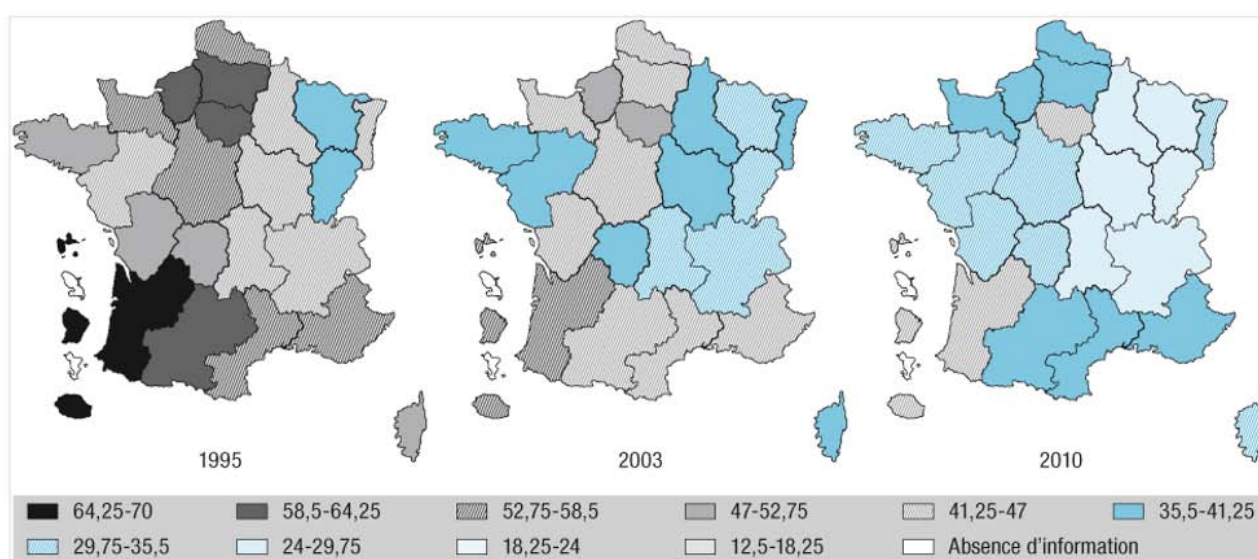


Figure 7: Évolution de la séroprévalence régionale de la toxoplasmose évaluée en pourcentage chez les femmes enceintes entre 1995 et 2010(32).

3. Aspects cliniques

3.1. Formes chez l'immunocompétent

Chez les sujets immunocompétents, l'infection par *T. gondii* reste asymptomatique dans 80% des cas (5).

Dans les rares cas symptomatiques, l'infection se traduit par un tableau clinique de lymphadénopathie fébrile caractérisée par des adénopathies fermes, mobiles et indolores en général cervicales apparaissant une semaine après la contamination (5) et parfois accompagnées d'une asthénie, d'une angine érythémateuse, de symptômes digestifs, d'unictère et/ou d'arthralgies (33). Ces symptômes s'accompagnent d'un syndrome mononucléosique sur le frottis sanguin caractérisé par la présence de lymphocytes activés très basophiles (34). Chez ces patients immunocompétents, l'évolution est favorable et spontanément résolutive.

Rarement, on peut observer une atteinte ophtalmologique à type de chorioretinite ou d'uvéïte associée à des signes cliniques assez marqués ; la méningite toxoplasmique a été décrite chez des enfants immunocompétents se traduisant sur un plan biologique par un LCR à majorité de lymphocytes (34). Un cas de myocardite aiguë à *T. gondii* a été rapporté récemment chez un jeune homme immunocompétent (35). Quelques exceptionnelles formes systémiques graves ont été décrites chez des individus immunocompétents notamment des cas imputés à la consommation de gibiers sauvages ont été observés en Guyane (36).

3.2. Formes chez l'immunodéprimé

Chez les sujets immunodéprimés, l'infection à *T. gondii* peut être très grave avec atteinte multiviscérale : pulmonaire, rénale, mais surtout encéphalique. Dans 95% des cas, il s'agit d'une réactivation d'une infection chronique plutôt que d'une primo-infection (37). La toxoplasmose de l'immunodéprimé est une infection opportuniste qui touche particulièrement les patients séropositifs pour le VIH avec un taux de lymphocytes T CD4 bas ($<100/\text{mm}^3$), les patients transplantés d'organes solides sous traitement immunosuppresseur, les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques et certains patients dans d'autres situations d'immunodépression (cancer, hémopathies malignes lymphoïdes, déficit immunitaire congénital....) (5). Plusieurs formes cliniques sont décrites :

- L'encéphalite toxoplasmique également appelée toxoplasmose cérébrale est l'atteinte la plus fréquente qui se manifeste par des abcès cérébraux (Figure 8) se traduisant par des signes neurologiques focaux dans un contexte fébrile avec troubles de la conscience voire troubles psychiatriques (38) ; elle est souvent associée à une rétinite toxoplasmique (Figure 9).

- La toxoplasmose pulmonaire (2 à 3% des cas), se traduit par une pneumopathie interstitielle diffuse fébrile (39).
- La toxoplasmose disséminée se présente sous forme d'une fièvre isolée suivie de localisations viscérales secondaires.



Figure 8: Abcès cérébral toxoplasmique chez un sujet immunodéprimé(5).



Figure 9: Chorioretinite toxoplasmique (5).

4. Diagnostic

4.1. Diagnostic sérologique : cinétique et mise en évidence des anticorps

4.1.1. Cinétique des anticorps

Les antigènes du toxoplasme vont engendrer l'apparition d'anticorps spécifiques qui appartiennent aux différentes classes d'immunoglobulines IgM, IgA et IgG (40). Chaque isotype présente sa propre cinétique (Figure 10).

Les IgM sont synthétisés en premier au cours de l'infection par *T. gondii* : ils commencent à apparaître une semaine après la contamination puis atteignent un plateau au bout d'un mois et persistent sur une période variable; ils peuvent rester détectables plus d'un an après la contamination.

Les IgA apparaissent dans le mois suivant la contamination, leur pic de production est atteint à 3 mois puis on observe leur négativation dans les 9 mois; ce sont des bons marqueurs d'infection toxoplasmique récente mais on ne les retrouve que dans 95% des cas de séroconversions toxoplasmiques ; ils sont également détectés lors de réactivations sérologiques.

Les IgG commencent à être sécrétés 2 semaines après la contamination jusqu'à atteindre un pic à 2 mois; on observe des titres élevés d'IgG pendant plusieurs mois puis leur décroissance mais ils ne disparaissent jamais complètement ; ils témoignent d'une immunité ancienne.

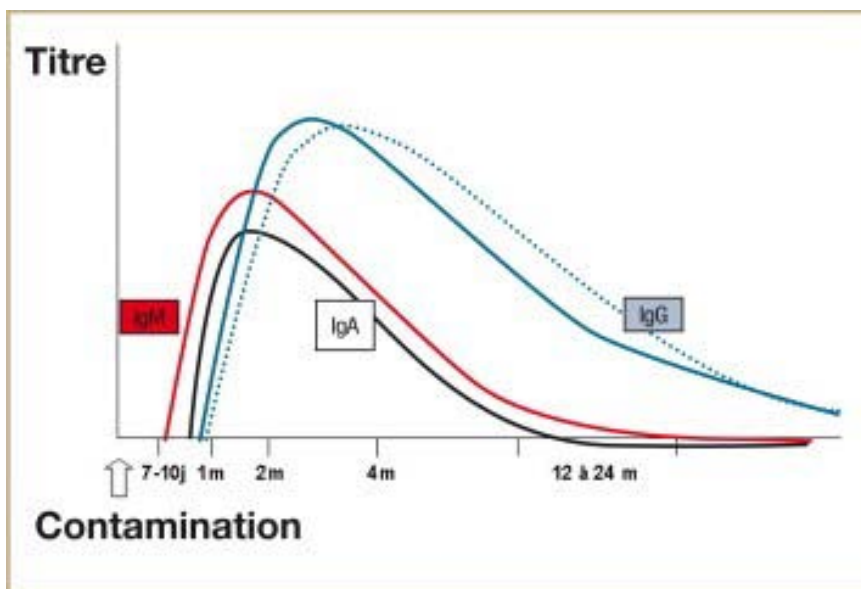


Figure 10: Cinétique d'apparition des anticorps anti-toxoplasme(40).

Cependant, il existe des cinétiques d'apparition des anticorps plus atypiques rendant l'interprétation sérologique parfois délicate (41).

4.1.2. Le Dye Test

Egalement appelé test de lyse des toxoplasmes vivants, il a été mis en place par Sabin et Feldman en 1948 et est toujours considéré comme le gold standard pour la détection des anticorps anti-toxoplasme mais il n'est plus réalisé que dans quelques laboratoires en France en raison de sa complexité technique et logistique (nécessité d'entretien d'une souche du parasite chez la souris) (42). Son principe repose sur la lyse de tachyzoïtes vivants par les anticorps anti-toxoplasmes présents dans le sérum à tester ; la lecture est réalisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase permettant de visualiser les parasites morts, apparaissant grisâtres alors que les toxoplasmes vivants restent brillants (43). On considère que la réaction est positive lorsqu'au moins 50% des toxoplasmes sont lysés ce qui correspond à un seuil de positivité de 2 UI/mL. C'est une technique de référence en raison de sa précocité de détection des anticorps (10 à 15 jours post contamination), de sa sensibilité, mais également de sa grande spécificité.

4.1.3. Techniques immuno-enzymatiques : détection des IgG, IgM et IgA

Les techniques immuno-enzymatiques appelées EIA (Enzyme ImmunoAssays) notamment de type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) utilisent les antigènes du toxoplasme fixés sur un support solide sur lequel est incubé le sérum du patient; les anticorps spécifiques anti-toxoplasmes contenus dans le sérum se fixent sur l'antigène et sont révélés par une antiglobuline humaine de type anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM marquée par une enzyme. Un substrat chromogène est alors hydrolysé par l'enzyme ce qui aboutit à la formation d'un composé coloré dont l'intensité est mesurée avec un spectrophotomètre (Figure 11); cette mesure est comparée à des valeurs de référence et retranscrite en UI/mL.

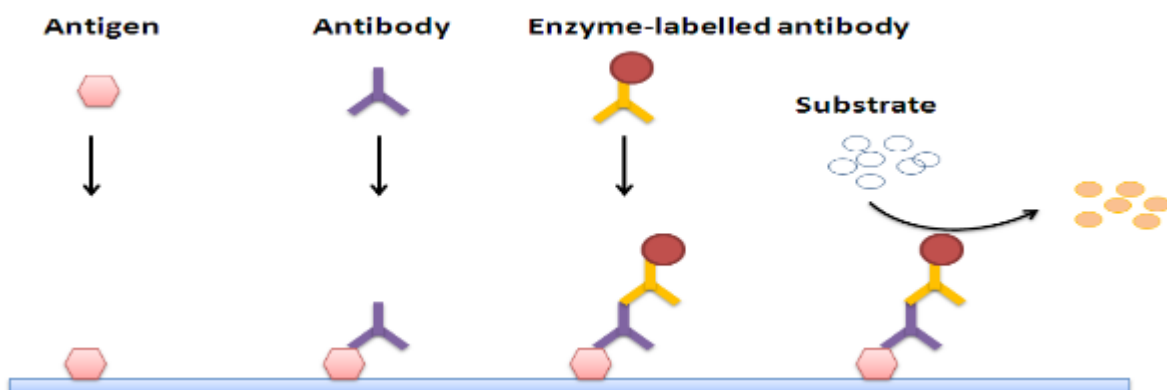


Figure 11: Principe de la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays)(44).

Les techniques automatisées utilisent d'autres systèmes de détection que la spectrophotométrie notamment la chimiluminescence et l'électrochimiluminescence (42,45).

Ces techniques immuno-enzymatiques, précises, reproductibles, sensibles et surtout automatisables, se sont largement répandues dans les laboratoires en routine et leurs performances sont aussi bonnes pour les IgM que pour les IgG ; elles sont par conséquent adaptées au screening sérologique (46). En revanche les performances sont variables dans la précocité de détection des séroconversions comme le démontre une récente étude française chez des femmes enceintes qui a comparé le délai de détection des IgG anti-*Toxoplasma* entre plusieurs tests commerciaux et a mis en évidence des durées différentielles de 11 à 28 jours (47) ; cette notion doit être prise en compte lors du choix des réactifs. Le principal inconvénient de ces tests est la mauvaise standardisation des résultats entre les différents coffrets commercialisés à cause d'une variation de qualité d'antigènes d'un kit à l'autre(45).

Concernant la détection des IgG par des techniques immuno-enzymatiques, le seuil de positivité diffère de 3 à 30 UI/mL selon le kit utilisé et un étalonnage est effectué à l'aide d'un sérum de référence international; la plupart des trousses proposent des seuils de positivité élevés conférant à la technique une bonne spécificité au détriment de la sensibilité (48) : il existe donc peu de faux positifs mais la plus faible sensibilité peut ne pas détecter des faibles taux d'IgG, ce qui engendre un suivi sérologique mensuel inutile de certaines femmes enceintes. Il existe une concordance globale satisfaisante entre les différents coffrets mais parfois des discordances sont retrouvées: jusqu'à 18,5% de discordance pour des sérums avec un faible titre d'anticorps (48), ce qui nécessite le recours à des tests de confirmation.

4.1.4. Test immunochromatographique

Le seul test disponible sur le marché est le test immunochromatographique *TOXOPLASMA* ICT IgG-IgM (commercialisé par LD BIO Diagnostics) qui permet la détection indifférente des IgG et des IgM anti-toxoplasmes dans le sérum humain. Ce test qualitatif est basé sur le principe d'une réaction immunologique dite « sandwich » c'est-à-dire que les anticorps anti-toxoplasme bivalents vont être « pris en sandwich » entre deux épitopes identiques correspondant à des antigènes de *T. gondii*. S'il y a présence d'IgG ou d'IgM anti-toxoplasme, ils vont se fixer sur les particules de latex rouge formant un complexe Ag-Ac qui va être capturé par la bande T : cette réaction va se traduire par l'apparition d'une bande rouge sur la bandelette affirmant la positivité du test et donc la présence d'anticorps anti toxoplasmes dans le sérum. En parallèle, les particules de latex bleu couplées à des anticorps anti-IgG de lapin vont être capturées par la bande C (gammaglobulines de lapin) ce qui va faire apparaître une bande bleue sur la bandelette témoignant du bon déroulement de la chromatographie (Figure 12). Les avantages de ce test sont sa rapidité et sa simplicité de réalisation et de lecture; cependant on ne fait pas de distinction entre les IgG et les IgM.

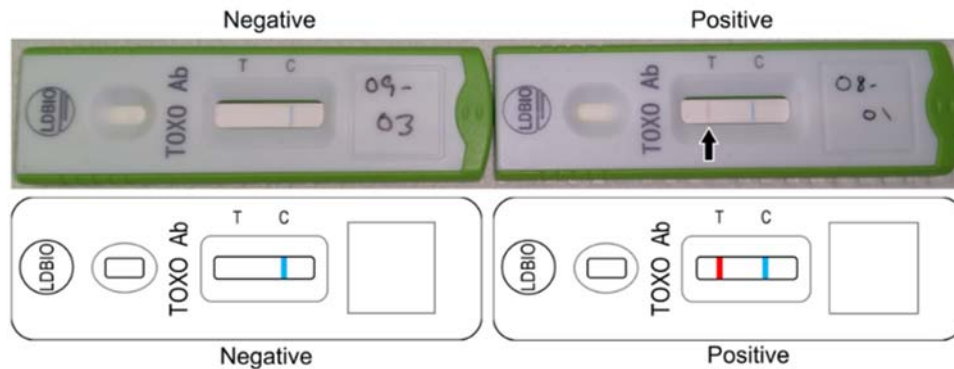


Figure 12: Test *Toxoplasma* ICT IgG-IgM.

A gauche, le test est négatif (présence de la bande contrôle bleue uniquement) et à droite le test est positif (présence des bandes bleue et rouge) (49).

4.1.5. Techniques complémentaires

4.1.5.1. ISAGA (Immuno-Sorbent AGglutination Assay)

Cette technique (commercialisée par BioMérieux) repose sur un principe d'immunocapture des IgM et des IgA (50). Le fond des puits des plaques est tapissé par des anticorps dirigés contre les IgM ou les IgA humaines : la première étape consiste à incuber le sérum humain dans les cupules ce qui permet une capture des immunoglobulines spécifiques ou non de *T. gondii* ; après un lavage, une suspension de toxoplasmes traités au formol est ajoutée dans les différentes cupules ; le test est positif s'il y a formation d'un voile qui correspond à la fixation des toxoplasmes sur les immunoglobulines spécifiques de *T. gondii* et est négatif s'il se forme un bouton de sédimentation au fond de la cupule ce qui signifie qu'il n'y a pas d'anticorps anti-toxoplasme dans le sérum (Figure 13). Pour quantifier les IgA ou les IgM, la même réaction est réalisée dans 3 cupules dans lesquelles on introduit 3 quantités croissantes d'antigènes ; à chaque cupule est attribuée un score de 0 à 4 en fonction de l'intensité du voile et le résultat final est semi-quantitatif se traduisant par un score entre 0 et 12 : négatif entre 0 et 5, équivoque entre 6 et 8 et positif entre 9 et 12 (si âge > 6 mois).

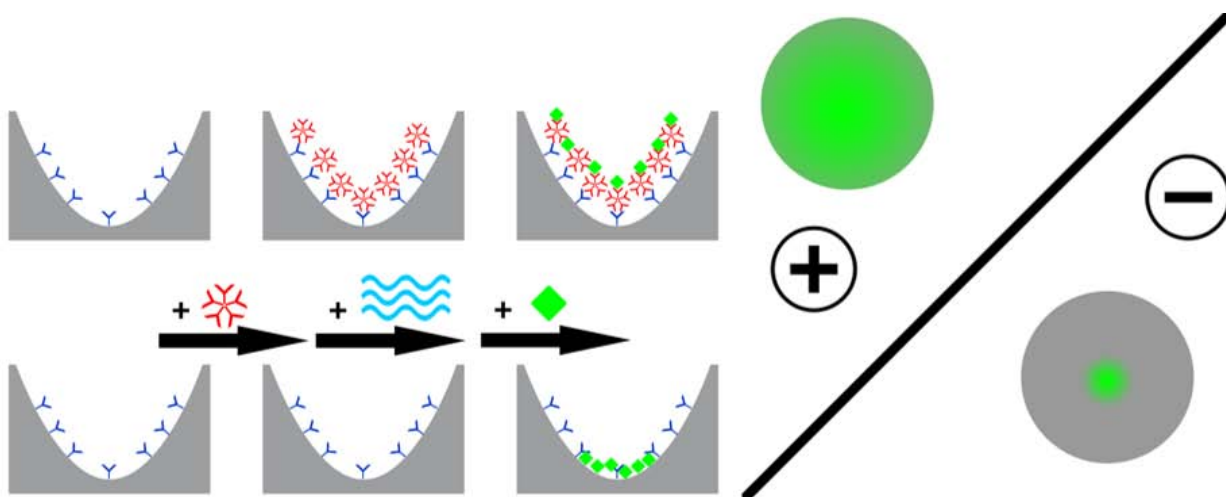


Figure 13: Test *Toxoplasma*ISAGA -IgM ou IgA

Une plaque de microtitrage est revêtue d'anticorps dirigés contre des Ig humaines (en bleu foncé) ; les Ig anti-toxoplasmes du sérum s'ils sont présents (en rouge) se lient aux anti-Ig; la plaque est lavée puis une suspension de toxoplasmes est ajoutée (en vert); il y a alors formation d'un voile car les complexes immunologiques vont tapisser la paroi de la cupule (51).

Il s'agit d'une technique sensible, proche de 100% (positivité précoce au moment de l'infection aiguë) et spécifique pour les IgM anti-toxoplasmes (non influencée par la présence de facteur rhumatoïde) mais sa lecture est parfois délicate et son résultat peut rester positif très longtemps après la séroconversion (50) ; chez 1/3 des patientes, les IgM sont détectées jusqu'à plus de 2 ans après la séroconversion toxoplasmique (52). Pour les IgA, cette technique est spécifique et sensible avec une détection jusqu'à plus d'un an après la contamination. C'est la technique validée sur les sangs de cordon.

4.1.5.2. Test d'avidité des IgG par technique ELISA modifiée

La notion d'avidité correspond à l'intensité de liaison entre un antigène et son anticorps spécifique. Cette mesure de l'avidité des IgG permet d'affiner la datation de l'infection quand il y a suspicion de contamination récente. L'avidité des IgG anti-toxoplasme augmente dans les semaines et mois suivant l'infection puis se stabilise (45). Le principe repose sur l'utilisation d'un agent dissociant qui va déstabiliser la liaison antigène-anticorps : s'il y a une forte avidité il n'y aura pas de dissociation antigène-anticorps alors que si cette avidité est faible, l'agent dissociant va séparer l'antigène et l'anticorps. Cette mesure se fait à l'aide de techniques immuno-enzymatiques de type ELISA automatisées en calculant le rapport des DO (densités optiques) mesurées avec et sans agent dissociant : on mesure ce que l'on appelle l'indice d'avidité des IgG. Il s'agit d'un test d'exclusion :

il permet d'éliminer une infection récente si l'avidité est forte; le délai d'exclusion se situe entre 3 et 5 mois en fonction de la trousse utilisée ce qui permet d'exclure une infection acquise en cours de grossesse si le test est réalisé pendant le premier trimestre (13,41,48). Mais à l'inverse, une faible avidité des IgG ne peut pas affirmer une infection récente. S'il est donc très exceptionnel d'avoir une avidité forte avec une infection récente, il est fréquent de se retrouver avec une avidité faible ou modérée associée à une infection ancienne. L'avidité n'est en revanche pas interprétable chez l'immunodéprimé ou suite à un traitement spécifique.

4.1.5.3. Western Blot

Le Western Blot est une technique d'immunoblot qui consiste à réaliser une incubation du sérum avec des bandelettes préalablement sensibilisées par des protéines antigéniques de toxoplasmes sur lesquelles vont se fixer les Ig anti-toxoplasme; il s'ensuit une étape de fixation d'anticorps anti-IgG humaines marqués par une enzyme, la phosphatase alcaline ; cette dernière va agir sur un substrat chromogène et faire apparaître des bandelettes violettes sur chaque bandelette (54). Par exemple, avec le kit *LDBio Toxo II IgG* qui détecte la présence d'IgG, on interprète le résultat de la façon suivante: la présence sur la bandelette d'au moins 3 bandes parmi les bandes spécifiques de poids 30, 31, 33, 40, 45 kDa et comprenant la bande à 30 kDa permet de conclure à un test positif c'est-à-dire à la présence d'anticorps IgG anti-*T. gondii* dans l'échantillon testé (Figure 14). Cette trousse est facile d'utilisation mais la lecture parfois délicate sur les taux faibles en IgG et son coût est élevé. Ainsi, on peut confirmer le statut sérologique positif d'une patiente avec des titres d'IgG autour du seuil de positivité ou confirmer une séroconversion toxoplasmique pendant la grossesse.

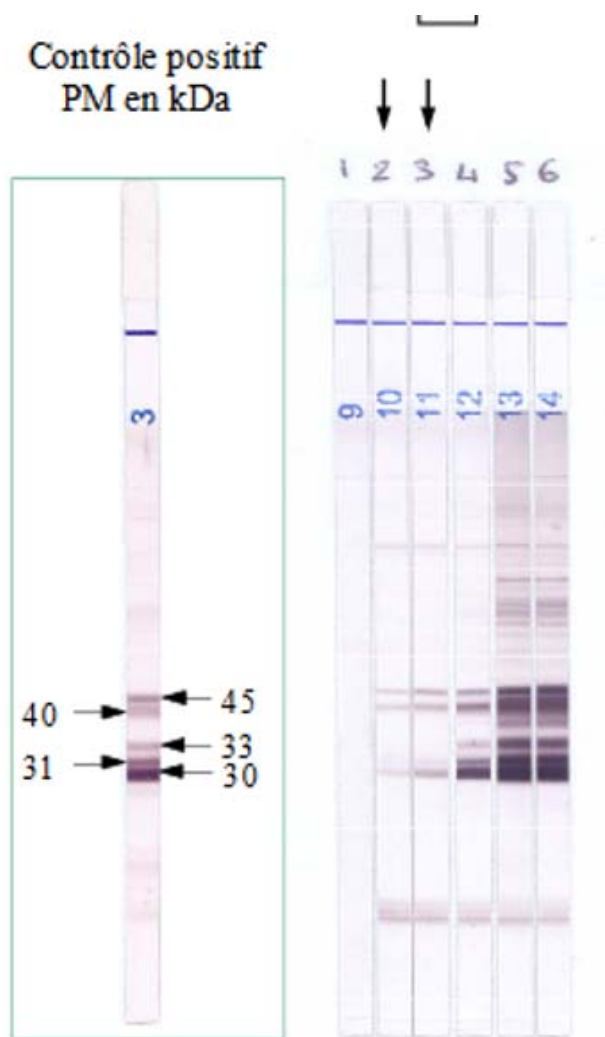


Figure 14 : Test Western Blot avec le kit LDBio Toxo II IgG.

Contrôle positif du kit à gauche qui permet d'identifier les bandes spécifiques (30, 31, 33, 40 et 45 kDa) ; les sérums 2, 3, 4, 5 et 6 sont positifs, le sérum 1 est négatif (54).

4.1.6. Autres techniques

4.1.6.1. L'immunofluorescence indirecte (IFI)

Cette technique utilise des tachyzoïtes entiers formolés et fixés sur une lame de verre contenant des puits dans lesquels on dépose différentes dilutions du sérum à tester ; s'il y a des anticorps anti-toxoplasme dans le sérum, ils vont se fixer sur les tachyzoïtes et seront révélés par un anticorps anti-IgG ou anti-IgM marqué à la fluorescéine (43); la lecture se fait donc au microscope à fluorescence. Le titre rendu correspond à la dernière dilution pour laquelle la membrane des tachyzoïtes apparaît entièrement fluorescente; ce titre est ensuite converti en UI/mL. La présence d'anticorps anti-nucléaires (AAN) et de facteur rhumatoïde peut entraîner l'apparition de faux positifs (53). Ces techniques ne sont plus utilisées dans la plupart des laboratoires.

4.1.6.2. Agglutination directe

C'est une technique de détection des IgG et des IgM. On réalise plusieurs dilutions du sérum à tester que l'on incube avec des toxoplasmes entiers dans des cupules ; on observe ensuite macroscopiquement s'il y a apparition d'une agglutination. Le test est positif (présence d'anticorps anti-toxoplasmes) s'il y a formation d'un voile et le test est négatif s'il y a une sédimentation au fond du puit. Le titre rendu concorde avec la dernière dilution positive couvrant la moitié de la cupule (42,45).

4.1.6.3. Agglutination directe sensibilisée

Le principe est le même que celui de l'agglutination directe mais rendue d'une part plus sensible par l'ajout de trypsine qui rend les parasites plus sensibles à l'action des IgG spécifiques et d'autre part plus spécifique par l'addition de 2-mercaptoéthanol qui détruit les IgM ; on ne détecte donc que les IgG (10,42).

4.1.6.4. Agglutination indirecte

Cette technique utilise des particules de latex sensibilisées avec un antigène toxoplasmique. S'il y a présence d'anticorps anti-toxoplasmes dans le sérum, les particules vont s'agglutiner et la lecture macroscopique peut se faire au bout de quelques minutes. C'est un test sensible et rapide mais des taux élevés d'anticorps peuvent rendre négatif le résultat et il n'y a pas de distinction entre les différents types d'immunoglobulines (45).

4.2. Diagnostic direct : recherche du parasite ou de son ADN

Il arrive que le diagnostic sérologique ne soit pas réalisable dans certains cas d'insuffisance du système immunitaire (altération ou immaturité). Dans ces situations, la mise en évidence du parasite s'avère nécessaire pour poser un diagnostic de toxoplasmose. Les toxoplasmes peuvent être retrouvés dans le liquide amniotique, le sang de cordon ou le placenta dans les cas de toxoplasmoses congénitales et dans la moelle, le LCR, le LBA ou les biopsies cérébrales dans des cas de toxoplasmoses graves du sujet immunodéprimé.

4.2.1. Coloration au MGG

Les tachyzoïtes de *T. gondii* peuvent être recherchés directement sur un frottis d'un liquide biologique ou sur une apposition de tissu après coloration par le MGG (May Grunwald Giemsa) puis lecture au microscope. Cependant, la sensibilité de cette technique est faible mais en cas de positivité, cette technique permet de rendre un résultat rapide(42).

4.2.2. PCR en temps réel

L'ADN du toxoplasme peut être recherché dans diverses natures de prélèvement. La PCR en temps réel est devenue une technique de choix notamment grâce à sa sensibilité pour la recherche directe de *T. gondii*. Plusieurs cibles ont été décrites : le gène B1 qui fut la première cible utilisée (répétée 35 fois chez le parasite) et surtout la séquence REP 529 (répétée plus de 200 fois dans le génome parasite) qui semble très performante dans la plupart des études (42,45,55,56).

4.2.3. Inoculation à la souris

La mise en évidence de *T. gondii* peut être faite en injectant un tissu ou un liquide biologique suspect à des souris par voie intra-péritonéale. Cette technique repose sur la détection d'une réponse immunitaire de la souris en réalisant une sérologie sur un prélèvement sanguin effectués quatre à six semaines après l'inoculation ; si cette sérologie s'avère positive, la présence de *T. gondii* est confirmée par la recherche de kystes cérébraux chez la souris sacrifiée (10). Cette technique nécessite la présence d'une animalerie au sein du laboratoire ainsi qu'une autorisation.

III. L'INFECTION A *TOXOPLASMA GONDII* CHEZ LA FEMME ENCEINTE

1. Incidence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes

Selon les données d'une étude réalisée entre 1995 et 2003 dans le cadre des enquêtes nationales périnatales, le taux d'incidence chez les femmes enceintes était variable en fonction de l'âge et de la région concernée (57) : très bas en Alsace, Picardie et Corse, élevé en Aquitaine et très élevé dans le Limousin. Entre 1995 et 2003, il a diminué en moyenne de près de 20 %, tous âges et régions confondus. En 2003, ce taux a été évalué en moyenne entre 6 et 7 pour 1 000 femmes enceintes (57). En 2010, l'incidence de la séroconversion pendant la grossesse a été évaluée à 1,9 pour 1000 femmes enceintes d'après les données du réseau TOXOSURV. En 2020, elle devrait diminuer et atteindre 1,6 pour 1000 femmes enceintes (58).

2. Prévention primaire de l'infection toxoplasmique : mesures hygiéno-diététiques

Une circulaire ministérielle datant du 27 septembre 1983 recommande d'informer les femmes enceintes non immunisées sur les moyens de prévenir une contamination toxoplasmique.

Parmi les mesures recommandées, reprises par l'HAS en octobre 2009, il y a des mesures indispensables dont l'efficacité a été démontrée(59):

- Bien se laver les mains avant chaque repas et surtout après avoir manipulé de la viande crue ou des crudités souillées ;
- Bien faire cuire tout type de viande à une température supérieure à 65°C dans toute l'épaisseur mais se méfier de la cuisson au barbecue avec laquelle la viande reste souvent crue à l'intérieur ;
- Bien nettoyer les légumes et les plantes aromatiques lors de la préparation des repas ;
- Laver soigneusement les ustensiles de cuisine et les plans de travail ;
- Porter des gants pour le jardinage et lors de tout contact avec la terre ;
- Faire laver quotidiennement le bac à litière du chat avec de l'eau bouillante ou mettre des gants pour effectuer cette tâche.

On retrouve également des mesures complémentaires :

- Surgeler (<-18°) les denrées alimentaires d'origine animale ;

- En dehors du domicile, ne manger de la viande que lorsqu'elle est bien cuite et privilégier la consommation de légumes cuits afin d'éviter la consommation de crudités ;
- Eviter de consommer du lait de chèvre cru, de la viande marinée, saumurée ou fumée, des fruits de mer (notamment huîtres, moules) et autres mollusques crus.

3. Réglementation en France : suivi sérologique mensuel

Un programme de surveillance sérologique des femmes enceintes a été mis en place en 1978 dont les buts sont (60) :

- De définir le statut sérologique de la patiente vis-à-vis de la toxoplasmose
- D'identifier les femmes enceintes non immunisées contre la toxoplasmose et donc à risque de primo-infection
- Transmettre les règles de prévention de la toxoplasmose afin de réduire leur risque de contamination
- Instaurer un suivi sérologique afin de diagnostiquer le plus tôt possible une séroconversion maternelle au cours de la grossesse

Depuis 1992, un décret d'application impose une sérologie de la toxoplasmose avant la fin du 1^{er} trimestre de grossesse si aucun résultat sérologique prouvant l'immunité acquise ne peut être fourni par la patiente, et une sérologie mensuelle jusqu'à la fin de la grossesse si la première sérologie est négative(61). La détermination du statut immunitaire avant la conception, bien que non obligatoire, réduirait les difficultés d'interprétation de certaines sérologies toxoplasmiques en cours de grossesse. Chez les femmes en âge de procréer, il pourrait même être intéressant de réaliser une sérologie lors de l'arrêt d'une contraception (62). De plus, il est vivement recommandé, afin de détecter les séroconversions de toute fin de grossesse, de réaliser un dernier contrôle sérologique 3 semaines à 1 mois post-partum (43).

4. Interprétation des profils sérologiques de la femme enceinte et conduite à tenir

Pour interpréter une sérologie toxoplasmique, il faut tenir compte de la présence d'IgG, d'IgM et éventuellement des IgA spécifiques, de leur cinétique et des techniques qui ont permis de les mettre en évidence. Dans les différents cas de figure présentés, il s'agit d'une première sérologie de début de grossesse faite avec une technique de type immuno-enzymatique (EIA) (41).

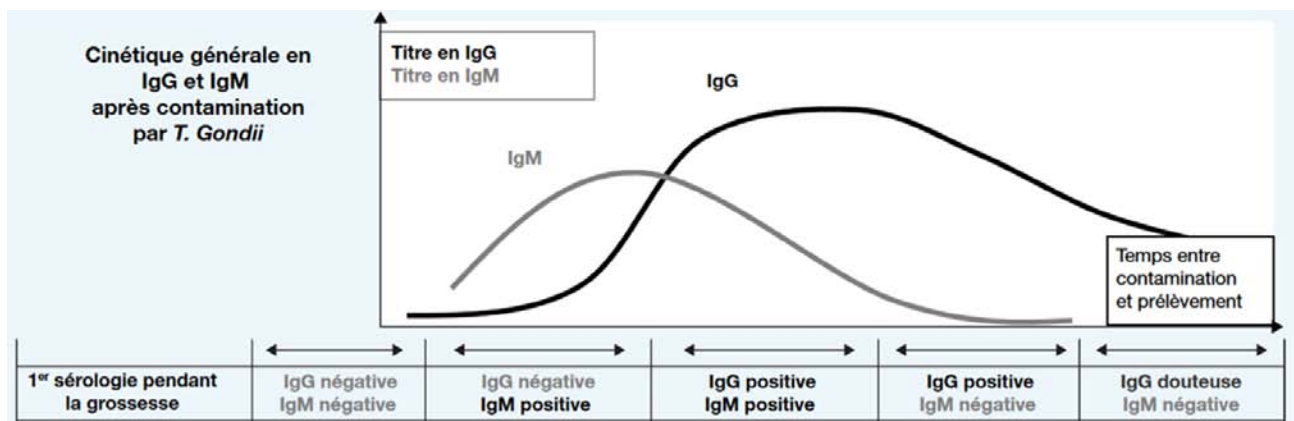


Figure 15: Cinétique d'apparition des IgG et des IgM après contamination par *T. gondii*(41).

4.1. Absence d'IgG et d'IgM

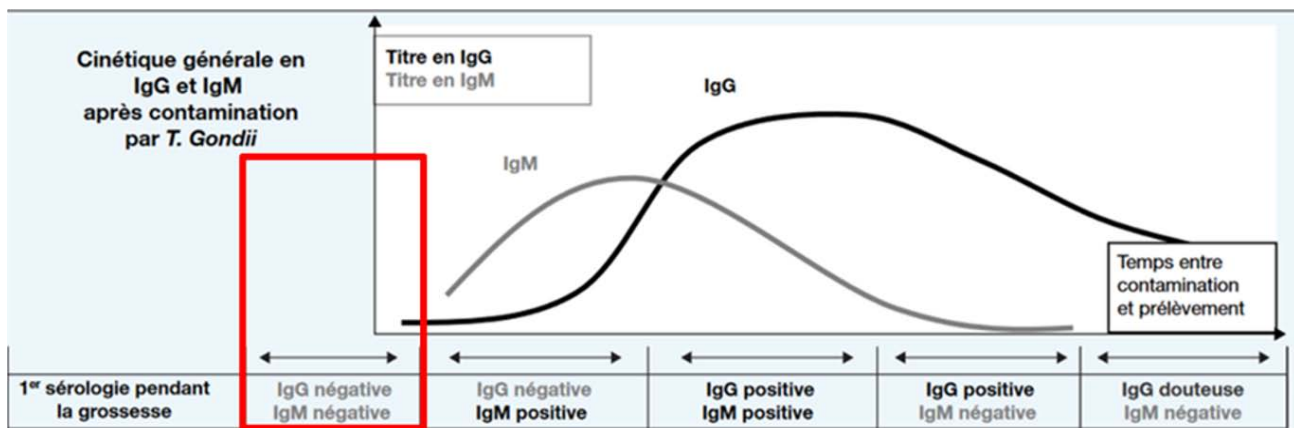


Figure 16: Sérologie toxoplasmique avec absence d'IgG et d'IgM (41).

La patiente n'est pas immunisée contre la toxoplasmose. Une contamination une à deux semaines avant l'analyse n'est pas exclue. Une surveillance sérologique mensuelle pendant toute la grossesse et 3 semaines après l'accouchement est mise en place ; les règles hygiéno-diététiques doivent être strictement respectées (Figure 17).

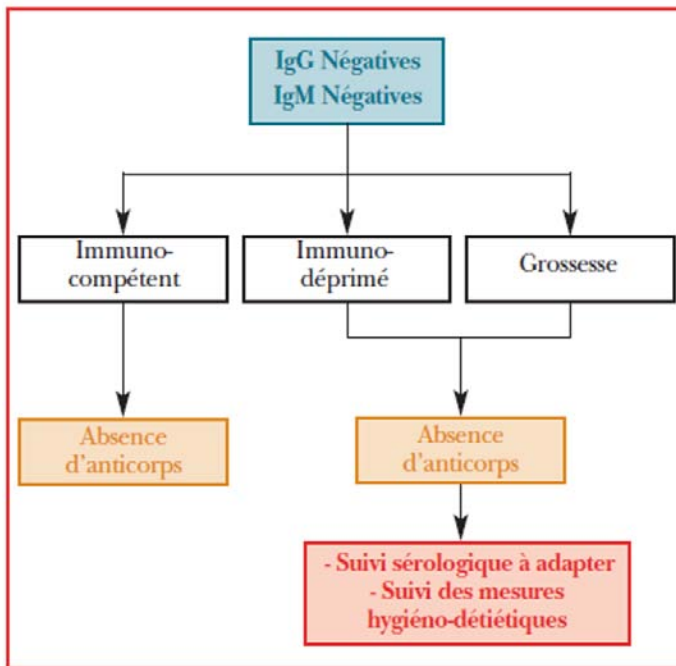


Figure 17: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM et des IgG négatives » (62).

4.2. Présence d'IgM et absence IgG

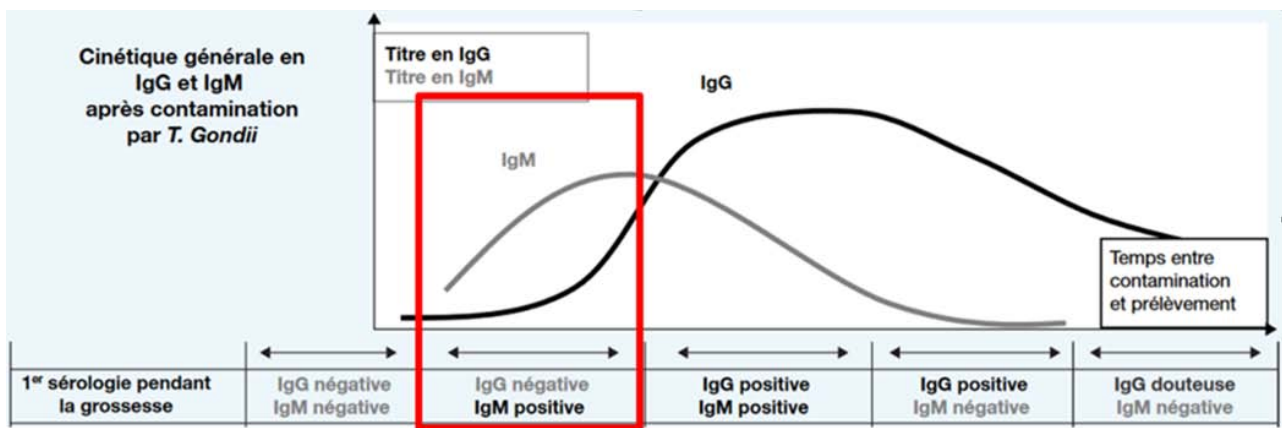


Figure 18: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgM et absence IgG (41).

Il s'agit soit de la présence d'IgM non spécifiques, soit d'un tout début de séroconversion toxoplasmique. Ce profil se retrouve à partir de sept jours et jusqu'à six semaines après la contamination. On doit confirmer la présence des IgM par une technique différente ; la technique ISAGA est la technique de choix dans ce cas et on se retrouve alors dans deux situations possibles :

- Dans le premier cas de figure, la technique de confirmation est négative : les IgM détectées sont probablement des IgM naturelles ou non spécifiques.

- Dans le second cas de figure, la technique de confirmation est positive : une récente infection toxoplasmique est très probable mais on ne peut pas exclure des IgM naturelles ou non spécifiques.

Dans les deux cas, on demande alors un contrôle sérologique à dix/quinze jours :

- Si le résultat est identique à celui du premier sérum, c'est-à-dire présence d'IgM et absence d'IgG, il peut s'agir d'IgM non spécifiques ; on effectue un autre contrôle des IgG deux semaines après
- S'il y a apparition d'IgG spécifiques, il s'agit d'une séroconversion : une prise en charge médicale est alors proposée à la patiente (Figure 19).

Une infection récente peut aussi être mise en évidence par la recherche d'IgA : l'apparition d'IgA associée aux IgM est en faveur d'une séroconversion toxoplasmique en cours qui doit être confirmée par l'apparition des IgG.

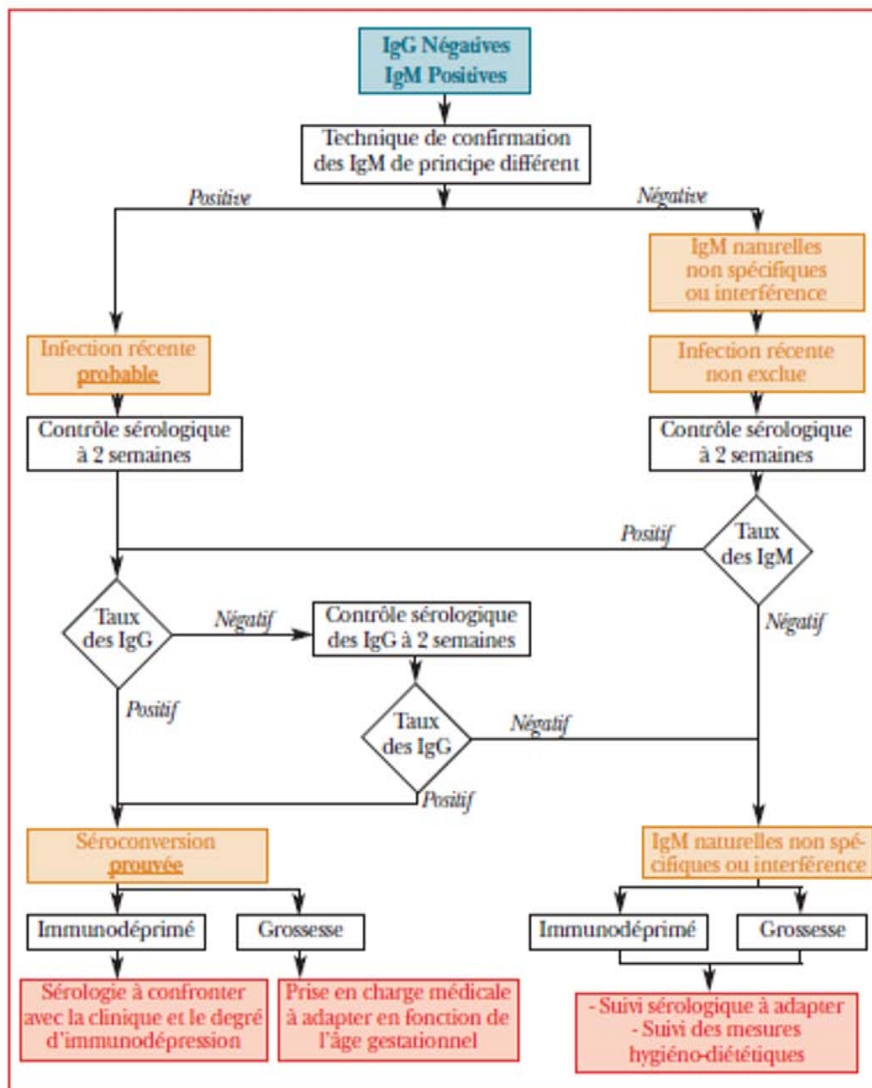


Figure 19: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM positives et des IgG négatives » (62).

4.3. Présence d'IgG et d'IgM

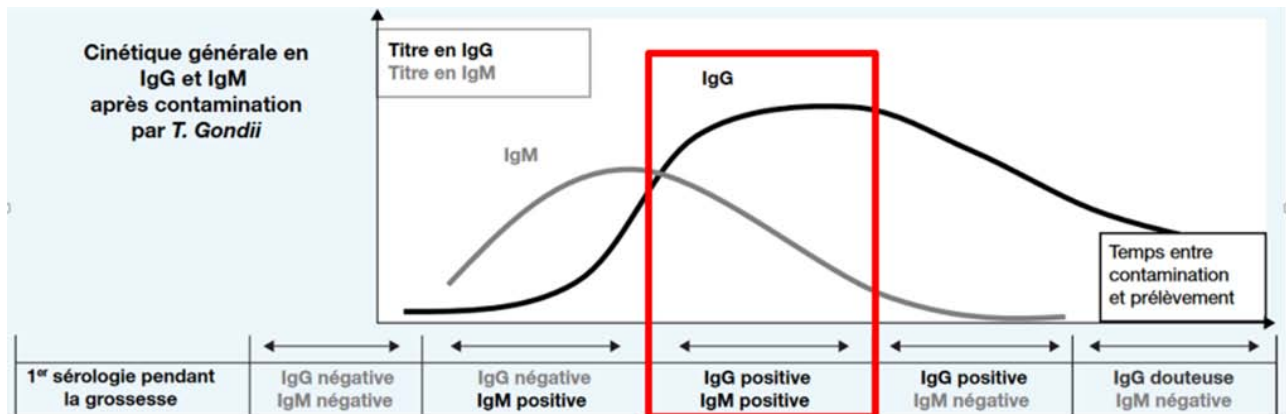


Figure 20: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgG et d'IgM (41).

Dans cette situation, il s'agit soit d'une séroconversion toxoplasmique récente, soit d'IgG spécifiques associées à des IgM non spécifiques ou résiduelles ; ce cas de figure est devenu fréquent avec l'augmentation de sensibilité des techniques. Ce profil de séroconversion est rencontré dès 3 semaines post contamination et jusqu'à plus de 2 ans. Il est primordial de connaître le moment de la contamination c'est à dire pendant la grossesse ou avant la conception ; on cherche alors soit à récupérer des sérums antérieurs soit à mesurer l'avidité des IgG :

- si cette avidité des IgG est forte, on exclut une infection de moins de 4 mois et donc on peut affirmer que la contamination a eu lieu avant la grossesse (à condition que le prélèvement ait été réalisé au premier trimestre de grossesse) ; on réalise tout de même un contrôle sérologique à 3 semaines.
- en revanche, si l'avidité des IgG est faible ou intermédiaire, on ne peut exclure une contamination récente ; on réalise donc une deuxième sérologie 3 semaines après dans le but de dater l'infection en s'aidant de la cinétique des anticorps :
 - ✓ si la quantité d'IgG reste stable, on conclut à une infection qui date de plus de 2 ou 3 mois par rapport à la date du premier sérum
 - ✓ si la quantité d'IgG augmente de manière significative (doublement du titre) par rapport au premier sérum, l'infection est récente, datant de moins de 2 à 3 mois (Figure 21).

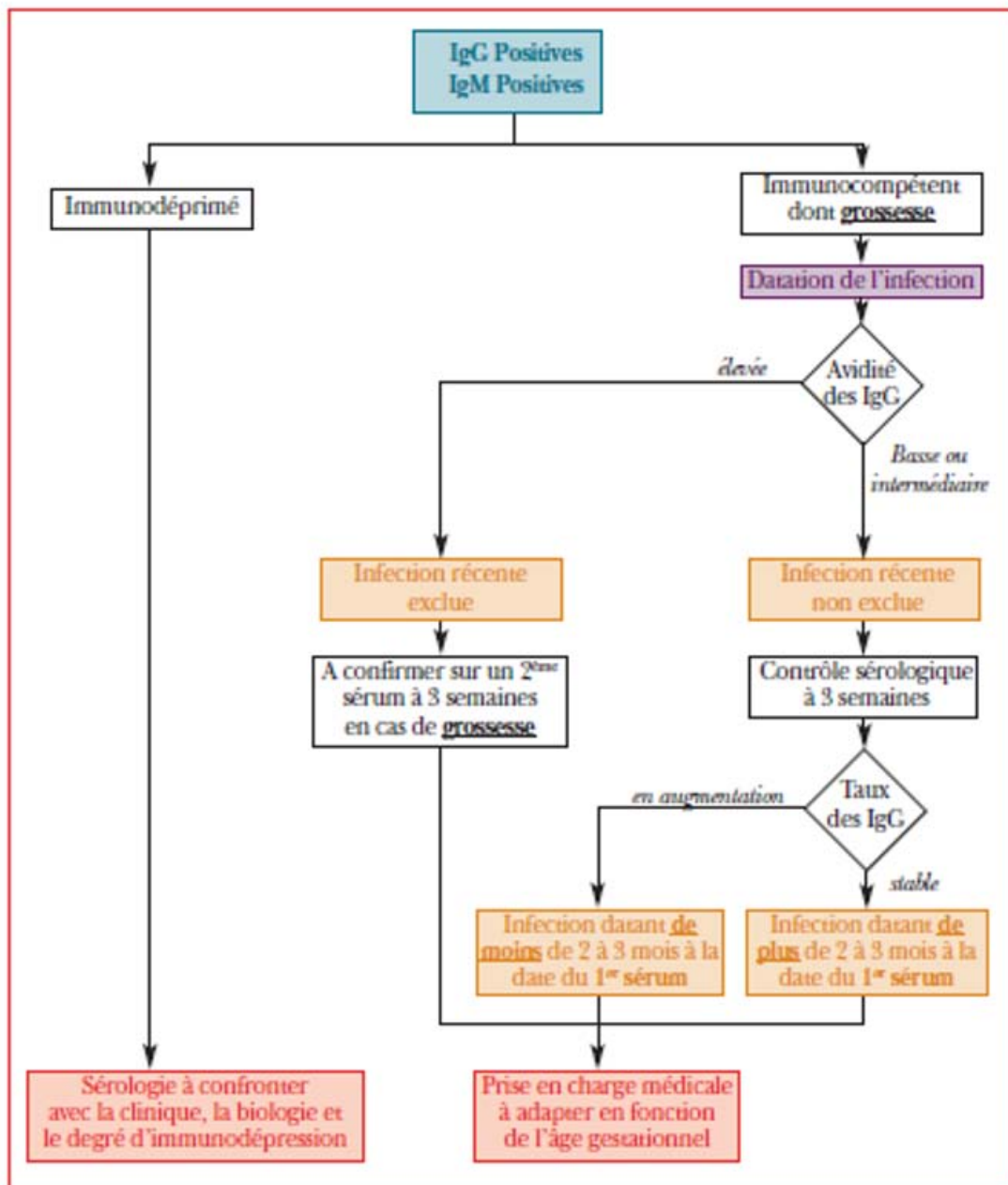


Figure 21: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM et des IgG positives » (62).

4.4. Présence d'IgG et absence d'IgM

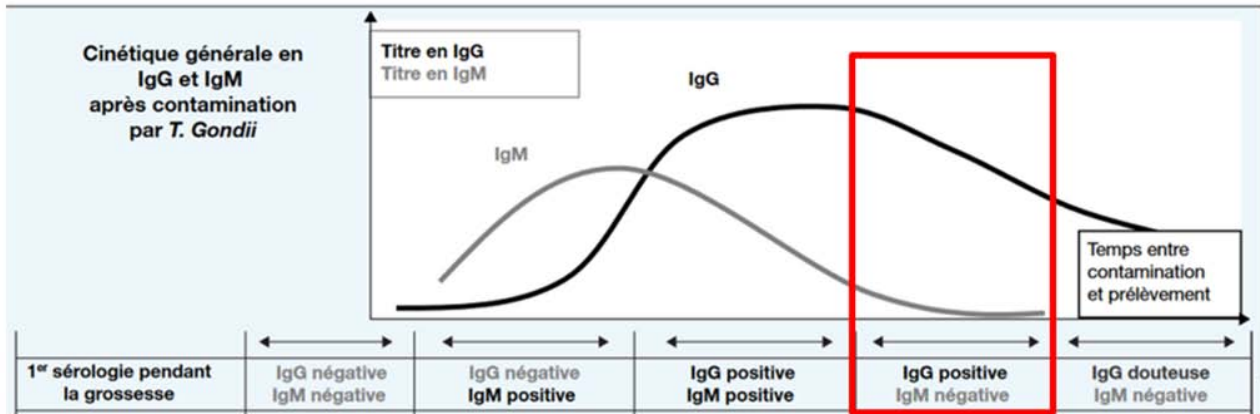


Figure 22: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgG et absence d'IgM (41).

La patiente a été immunisée lors d'une infection ancienne. On retrouve ce profil plus de six mois post contamination. On effectue un contrôle sérologique à 3 semaines :

- Si les IgG sont stables, on pourra conclure à une infection ancienne
- Par contre, s'il y a une augmentation significative du taux des IgG, on doit réaliser une avidité des IgG sur le premier sérum afin de dater l'infection :
- Si l'avidité est forte, on conclut à une réactivation sérologique probable d'une infection ancienne; il n'y a alors aucun risque pour le fœtus à condition que la femme enceinte soit immunocompétente.
- Si l'avidité est faible ou intermédiaire, on ne peut exclure une infection récente sans IgM associées; il a en effet été rapporté par le CNR de rares cas de séroconversion sans IgM ou avec des IgM fugaces (63) (Figure 23).

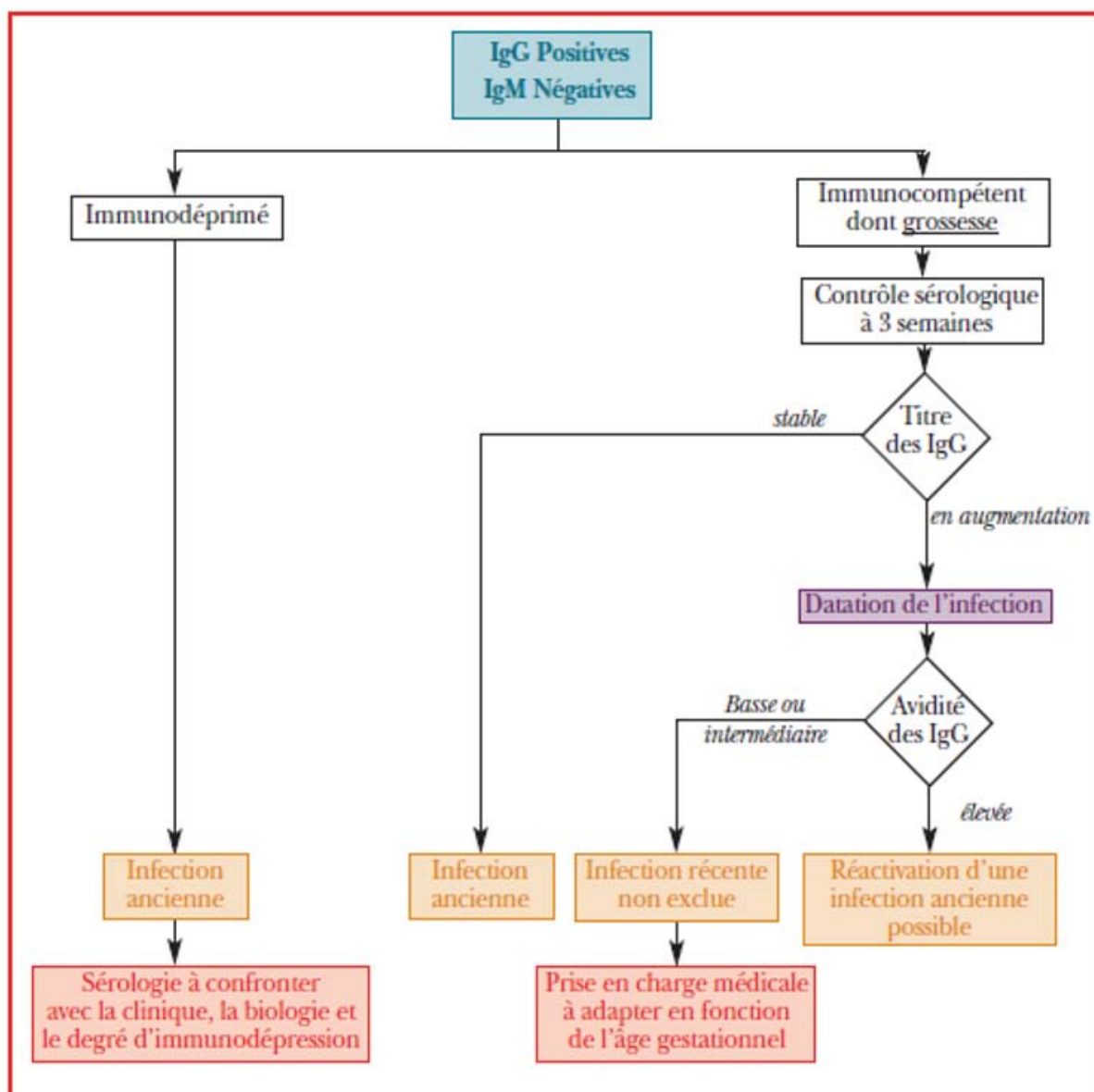


Figure 23: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM négatives et des IgG positives » (62).

En règle générale, lorsque l'interprétation des sérologies est difficile, il est recommandé de débiter un traitement chez les femmes enceintes et de suivre les nouveau-nés (63).

4.5. Présence d'IgG à un taux équivoque et absence d'IgM

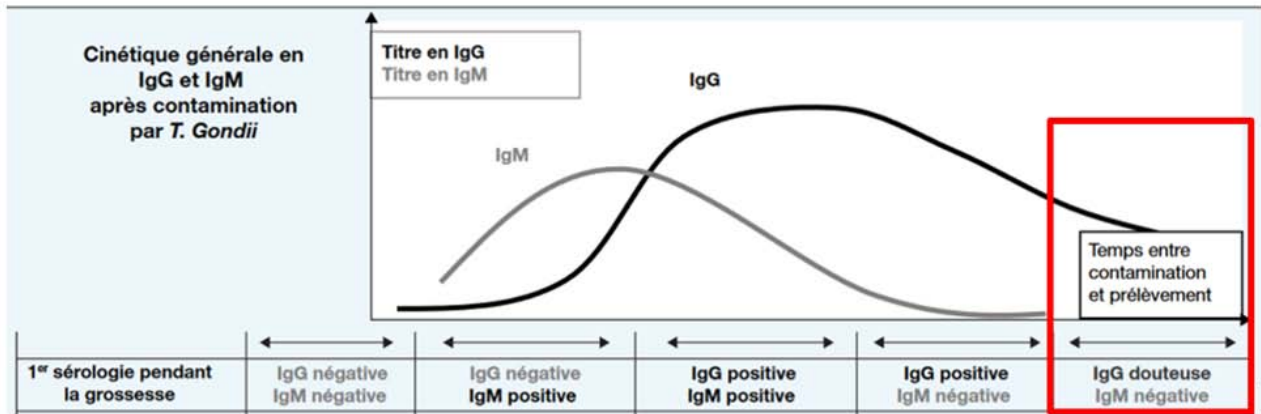


Figure 24: Sérologie toxoplasmique avec présence d'IgG à un taux équivoque et absence d'IgM (41).

Lorsque le taux d'IgG est équivoque, se pose la question du statut immunitaire de la femme enceinte et donc de sa surveillance sérologique mensuelle pour la suite de la grossesse. On réalise une deuxième technique de détection des IgG basée sur un principe différent :

- s'il y a absence d'IgG, on conclut à l'absence d'anticorps spécifiques
- s'il y a présence d'IgG, il s'agit d'une probable infection ancienne : on confirme ces résultats à 3 semaines sur un nouveau sérum.

Si la deuxième technique est elle aussi équivoque, il est recommandé de réaliser une technique complémentaire dans un laboratoire expert : Dye Test ou Western Blot (Figure 25).

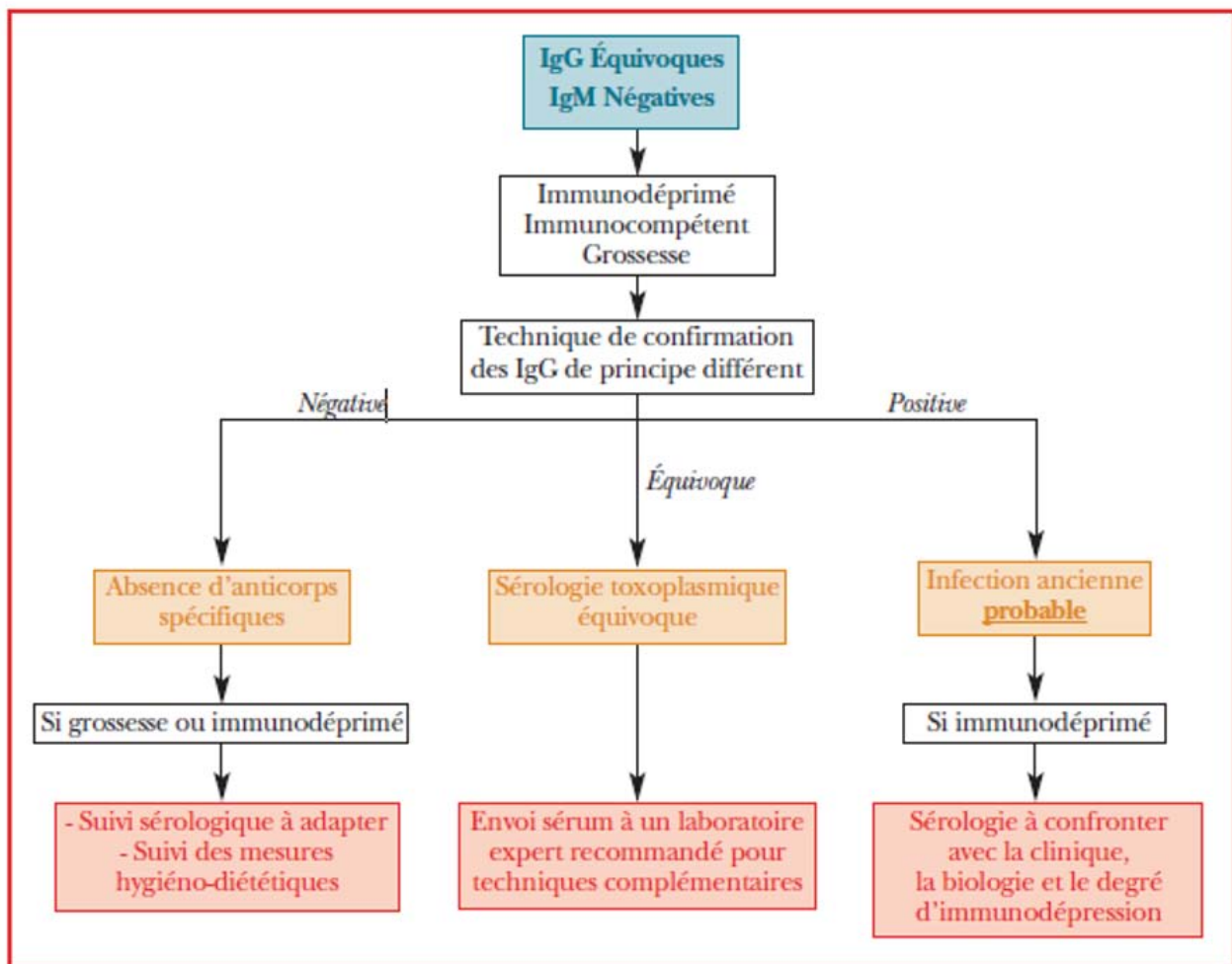


Figure 25: « Interprétation et conduite à tenir face à une sérologie de la toxoplasmose avec des IgM négatives et des IgG équivoques » (62).

IV. LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE

1. Définition

La toxoplasmose congénitale correspond à l'infection du fœtus par les toxoplasmes. En France, plusieurs situations définissent un cas de toxoplasmose congénitale(65): il faut que la mère ait contracté une infection toxoplasmique durant la grossesse ou les semaines précédant la grossesse et que le diagnostic ait été prouvé :

- o soit par la détection de *T. gondii* dans le placenta (argument seul non suffisant), le liquide amniotique, le sang de cordon ou un liquide biologique issu du nouveau-né (LCR, liquide d'ascite ou sang périphérique), les produits d'avortement par inoculation à la souris, PCR ou culture cellulaire
- o soit par une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre *T. gondii* chez l'enfant par la mise en évidence :
 - de la persistance d'IgM ou d'IgA au-delà de J10
 - ou d'IgG, IgM ou IgA néo-synthétisés par le bébé mis en évidence par une technique de profil comparé
 - ou d'une augmentation des IgG anti-toxoplasme sur plusieurs prélèvements successifs après un mois de vie
 - ou de la persistance des IgG spécifiques à l'âge de 1 an

La mise en évidence de *T. gondii* dans le placenta ne suffit pas pour poser un diagnostic de toxoplasmose congénitale : il faut obligatoirement confirmer le diagnostic par un autre critère biologique qu'il soit parasitologique ou immunologique (2).

2. Transmission materno-foetale

L'infection fœtale survient en moyenne dans 30% des cas de séroconversion maternelle lors de la grossesse (1). La transmission de *T. gondii* au fœtus se fait par enchainement de plusieurs étapes : tout d'abord une primo-infection chez la mère pendant la grossesse caractérisée par une phase de parasitémie précoce d'une quinzaine de jours puis le passage et la multiplication de tachyzoïtes au niveau du placenta et ensuite le passage dans la circulation sanguine du fœtus. Cependant, l'infection du fœtus n'est pas systématique lors d'une contamination maternelle et même lorsque le placenta est atteint par les tachyzoïtes ; en effet le placenta est une barrière protectrice qui retarde l'invasion fœtale par le toxoplasme surtout en début de grossesse mais le risque de transmission augmente au cours de la grossesse car la vascularisation placentaire se développe et donc le risque

de passage du parasite dans la circulation fœtale est accru. Ainsi, lors d'une contamination en début de grossesse le risque de transmission de *T. gondii* au fœtus est faible mais l'atteinte est grave (mort fœtale in utero, fausse couche précoce) (65) et inversement lors d'une infection plus tardive, le risque de transmission augmente mais les atteintes sont moins sévères voire infra-cliniques car le système immunitaire est déjà développé (Figures 26 et 27) (66).

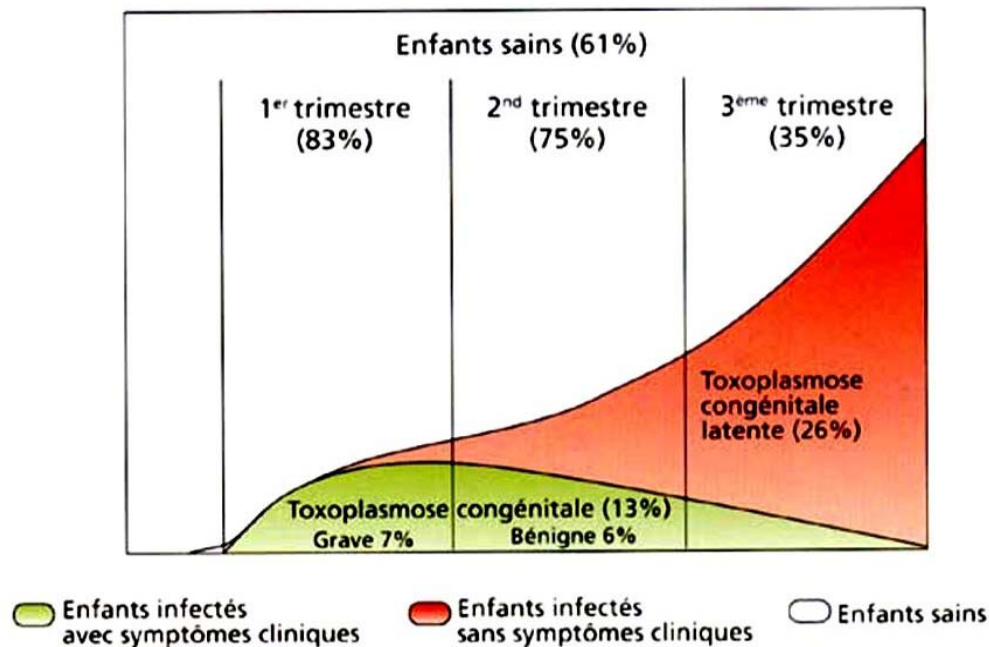


Figure 26: Risque de transmission et gravité de la toxoplasmose congénitale en fonction du terme de la grossesse (5).

Trimestre de grossesse	n	%
AntéC / PeriC	1	0,5
T1	5	2,6
T2	50	26,0
T3	108	56,3
DM	28	14,6
Total	192	100,00

Figure 27: Nombre de cas de TC diagnostiqués en France entre le 1er Janvier et le 31 décembre 2016 en fonction du trimestre de la grossesse n=(192) (2)

DM = donnée manquante.

Certains cas de réactivations de kystes quiescents à l'origine d'une toxoplasmose congénitale ont été rapportés chez des femmes enceintes immunodéprimées (67).

3. Epidémiologie

En 2007, un dispositif de surveillance nationale de la toxoplasmose congénitale appelé TOXOSURV a été mis en place: il s'agit d'une notification des cas de toxoplasmose congénitale par 48 laboratoires qui les déclarent via le site internet du CNR. Ce système de surveillance a pour objectifs principaux d'évaluer la prévalence de la toxoplasmose congénitale en France, d'estimer le nombre de toxoplasmoses congénitales sévères et ainsi de constituer une base de données nationale permettant de juger de l'efficacité des mesures préventives mises en place depuis 1978. En 2016, ce dispositif a permis de recenser 192 cas de toxoplasmose congénitale. Une enquête nationale datant de 1995 avait évalué l'incidence de la toxoplasmose congénitale entre 2,4 et 6,6 cas pour 1000 naissances en France (68) .

En 2007, cette incidence est descendue à 0,34 pour 1000 naissances vivantes (65) pour atteindre 0,29 pour 1000 naissances en 2015(2). Le nombre de cas de toxoplasmose congénitale est plus important chez les femmes ayant moins de 20 ans avec 0,47 cas pour 1000 naissances en 2016 (Figure 28).

Classe d'âge	Age des mères en France (attention données 2014 !)	TC	Taux pour 1000 naissance
< 20 ans	12 739	6	0,47
20 – 24	86 291	17	0,20
25 – 29	228 362	55	0,24
30 –34	267 957	52	0,19
35 – 39	147 769	37	0,25
> 40 -44	40 522	7	0,17
Total	783 640	174	
donnée manquante		18	

Figure 28: Nombre de cas de TC diagnostiqués en France pour 1000 naissances du 1er Janvier au 31 décembre 2016 selon l'âge des femmes (2).

Le nombre de cas est variable en fonction des régions françaises (Figure 29) ; en 2015,il était : élevé en Aquitaine, Limousin et Martinique (> 0,60 cas de TC pour 1000 naissances), et relativement faible en Centre, Alsace-Lorraine, Franche Comté, Picardie, Corse et à la Réunion (< 0,19 cas de TC pour 1000 naissances).

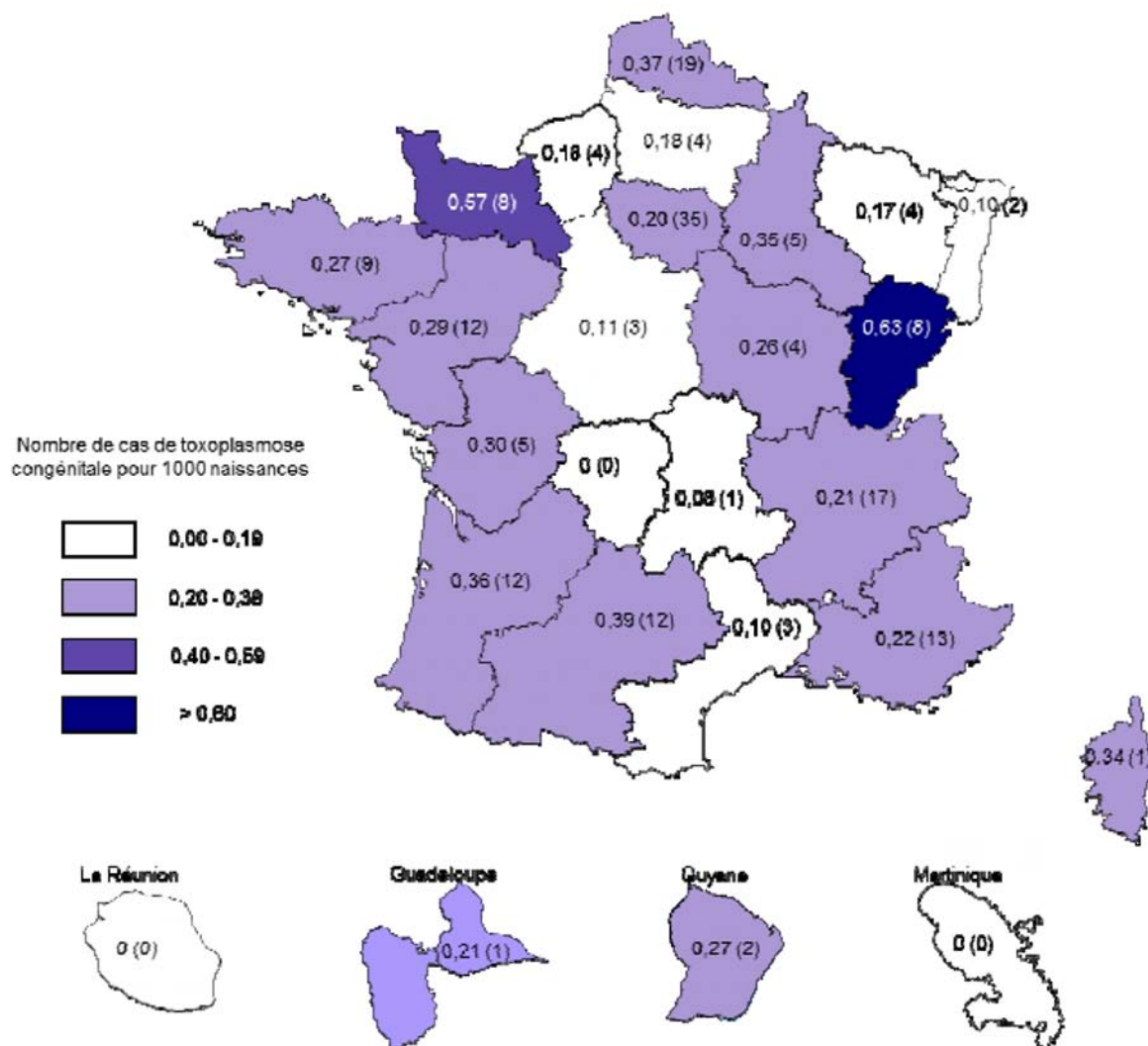


Figure 29 : Distribution régionale du nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France du 1er Janvier au 31 décembre 2016 pour 1000 naissances (2).

4. Lésions cliniques

4.1. Stades de gravité

L'infection du fœtus par *T. gondii* peut se traduire de différentes manières : une interruption spontanée de grossesse, une mort fœtale in utero, une atteinte clinique ou une forme infraclinique. En fonction du terme de la grossesse, l'atteinte fœtale sera plus ou moins grave ; les signes cliniques de toxoplasmose congénitale sont répertoriés en quatre formes d'atteinte(2):

- la toxoplasmose congénitale infraclinique lors d'une contamination de fin de grossesse est la forme la plus fréquente avec un diagnostic strictement biologique ; cependant il existe un risque d'évolution vers une atteinte oculaire plusieurs années après, pendant l'enfance voire même à l'âge adulte.

- La toxoplasmose congénitale modérée est caractérisée par une atteinte oculaire périphérique avec une acuité visuelle conservée ; elle est parfois associée à des calcifications intracrâniennes mais sans manifestation clinique.
- La toxoplasmose congénitale sévère lors d'une contamination en début de grossesse correspond à une atteinte oculaire avec une diminution de l'acuité visuelle associée à une hydrocéphalie ou une microcéphalie avec calcifications encéphaliques se traduisant par une déficience intellectuelle et des troubles neurologiques à type de paralysies, hypotonie, nystagmus...
- La toxoplasmose congénitale disséminée est rare et se caractérise par une atteinte multiviscérale : hépatomégalie avec ictère néonatal, splénomégalie, myocardite, lésions cutanées

4.2. Lésions chorio-rétiniennes

Deux zones sont préférentiellement touchées dans la toxoplasmose oculaire : la rétine, siège de lésions nécrotiques et la choroïde, touchée par des lésions inflammatoires (Figure 30). Ces lésions, unilatérales ou bilatérales, constituent la forme clinique oculaire la plus fréquente de toxoplasmose congénitale appelée chorio-rétinite. Ces foyers rétino-choroïdiens notamment au niveau de la macula entraînent une baisse acuité visuelle importante (71). La réactivation de kystes intrarétiniens est à l'origine de chorio-rétinites d'évolution tardive, parfois plusieurs années après la naissance.

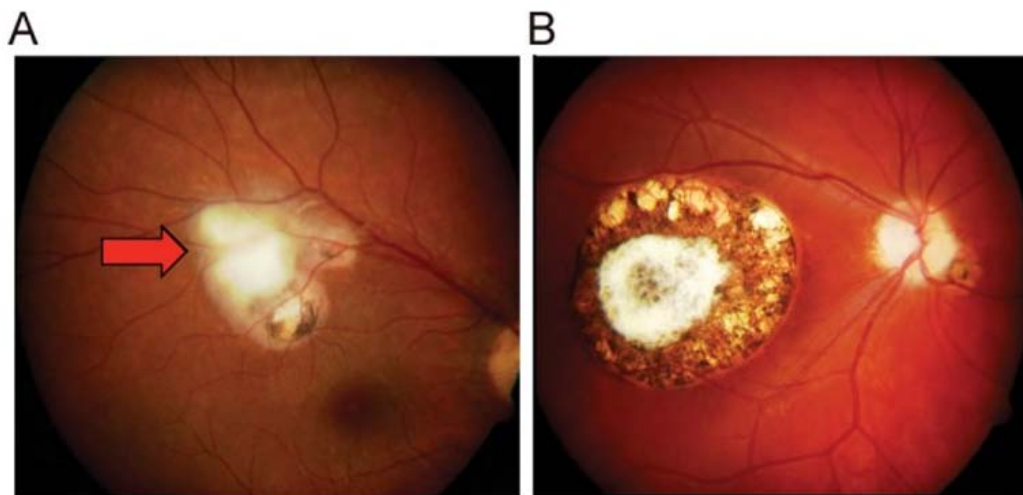


Figure 30: Lésions de chorio-rétinite chez des patients atteints de toxoplasmose congénitale(69).

A : Lésion évolutive de chorio-rétinite caractérisée par un œdème (inflammation active) associé à des cicatrices pigmentées. B : Cicatrice de chorio-rétinite très évocatrice de toxoplasmose congénitale caractérisée par un placard blanchâtre centré par une zone grisâtre surélevée et entourée d'une accumulation pigmentaire(70).

4.3. Lésions neurologiques

Concernant les atteintes neurologiques, on observe des calcifications intracrâniennes au niveau de l'encéphale correspondant à des foyers de nécrose calcifiés ; elles sont principalement retrouvées dans les régions péri-ventriculaires et au niveau des noyaux gris centraux et du thalamus. Les crises convulsives sont souvent le signe révélateur de ces lésions encéphaliques. L'hydrocéphalie, liée à l'obstruction de l'aqueduc de Sylvius, se traduit à l'échographie, par une dilatation ventriculaire bilatérale et symétrique, on peut donc la diagnostiquer en période anténatale. La microcéphalie qui correspond à l'absence de développement cérébral est beaucoup plus rare(71).

5. Diagnostic de la toxoplasmose congénitale

5.1. Diagnostic prénatal

Le dépistage prénatal de la toxoplasmose congénitale, effectué si une séroconversion toxoplasmique maternelle a été mise en évidence pendant la grossesse, combine des analyses biologiques à des imageries échographiques. Son intérêt est de dépister une toxoplasmose congénitale chez le fœtus afin d'instaurer un traitement *in utero*.

5.1.1. Diagnostic prénatal biologique (DPN)

Le DPN biologique s'effectue en recherchant le toxoplasme dans le liquide amniotique prélevé lors d'une amniocentèse. Cette analyse, remboursée par la sécurité sociale, nécessite un consentement écrit de la patiente et une attestation d'information sur le déroulement du geste fournie par le médecin prescripteur. Il est recommandé que le prélèvement de liquide amniotique soit réalisé à partir de 18 SA et un intervalle minimal de 4 semaines post-contamination maternelle afin de respecter le délai de transmission du parasite de la mère au fœtus (72). En fonction de la date de la séroconversion, plusieurs situations se présentent (73) :

- Lors d'une infection péri-conceptionnelle, la réalisation de l'amniocentèse n'est pas systématiquement réalisée.
- Lors d'une infection entre post-conceptionnelle et avant 36 SA, l'amniocentèse est systématiquement proposée car la balance bénéfique/risque du geste est en sa faveur; le risque de perte fœtale est estimé à 0,5% (74).
- Lors d'une infection après 36 SA, deux solutions sont discutées : soit la réalisation d'une amniocentèse assortie d'un traitement curatif par pyriméthamine/sulfamide, soit le déclenchement de l'accouchement.

Ces situations sont résumées dans la Figure 31.

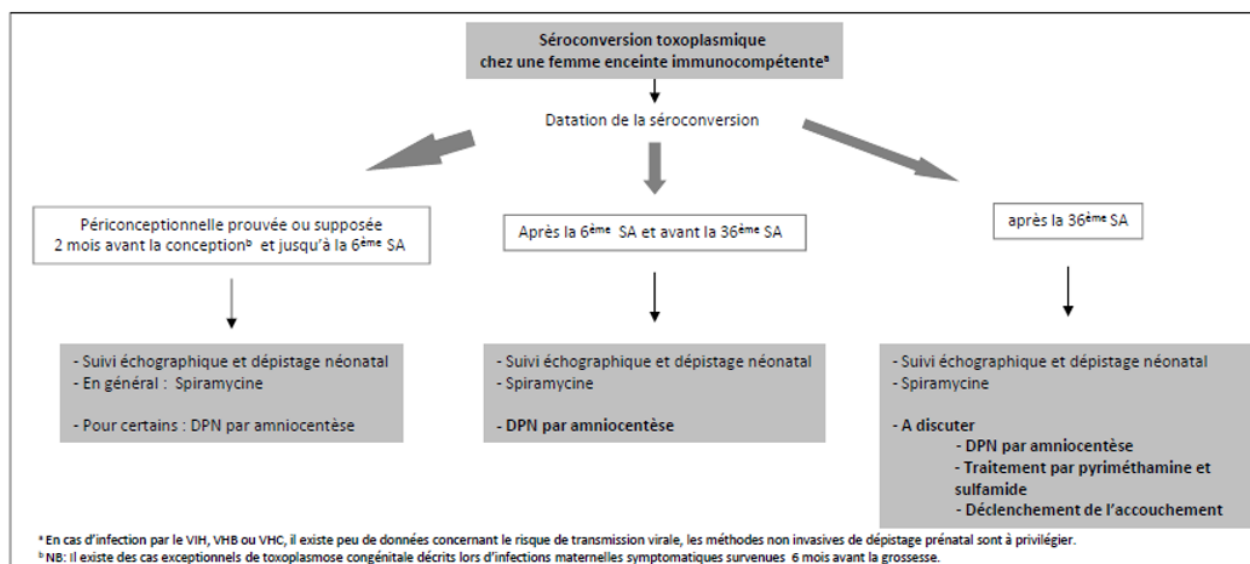


Figure 31: « Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale »(75).

La recherche de *T. gondii* dans le liquide amniotique est réalisée par deux techniques :

- La détection d'ADN toxoplasmique par PCR (76) pour laquelle un volume de 10 à 20 mL de liquide amniotique est conseillée ; cette technique a une sensibilité qui varie de 65 à 90% selon la cible génique utilisée et une spécificité de 100% ; il y a cependant un risque de faux négatifs si le passage placentaire est tardif ou si la charge parasitaire est faible.
- L'inoculation intrapéritonéale à des souris (77). Cette technique n'a plus sa place dans le diagnostic mais permet l'isolement des souches (78).

En cas de DPN positif, le diagnostic de toxoplasmose congénitale est posé ce qui implique la mise en route d'un traitement médicamenteux qui doit être la plus précoce possible afin de limiter le risque de séquelles importantes (79) : il s'agit de l'association de pyriméthamine et d'un sulfamide (sulfadiazine ou sulfadoxine) assorti d'une prescription d'acide folique pour limiter les effets secondaires hématologiques des sulfamides.

Si le DPN est négatif, la probabilité qu'il n'y ait pas d'infection fœtale est forte ; cependant cette négativité n'exclut pas le risque d'une toxoplasmose congénitale (10 à 15% des faux négatifs). Ce risque explique l'indication actuelle à poursuivre le traitement par spiramycine jusqu'à la naissance et à maintenir une surveillance échographique mensuelle. Il faut informer la mère sur la nécessité d'un bilan néonatal spécifique et d'un suivi de l'enfant jusqu'à la preuve qu'il n'a pas été infecté (76).

La conduite à tenir concernant le DPN de la toxoplasmose, recommandée par le CNR, et son interprétation sont présentées dans la Figure 32.

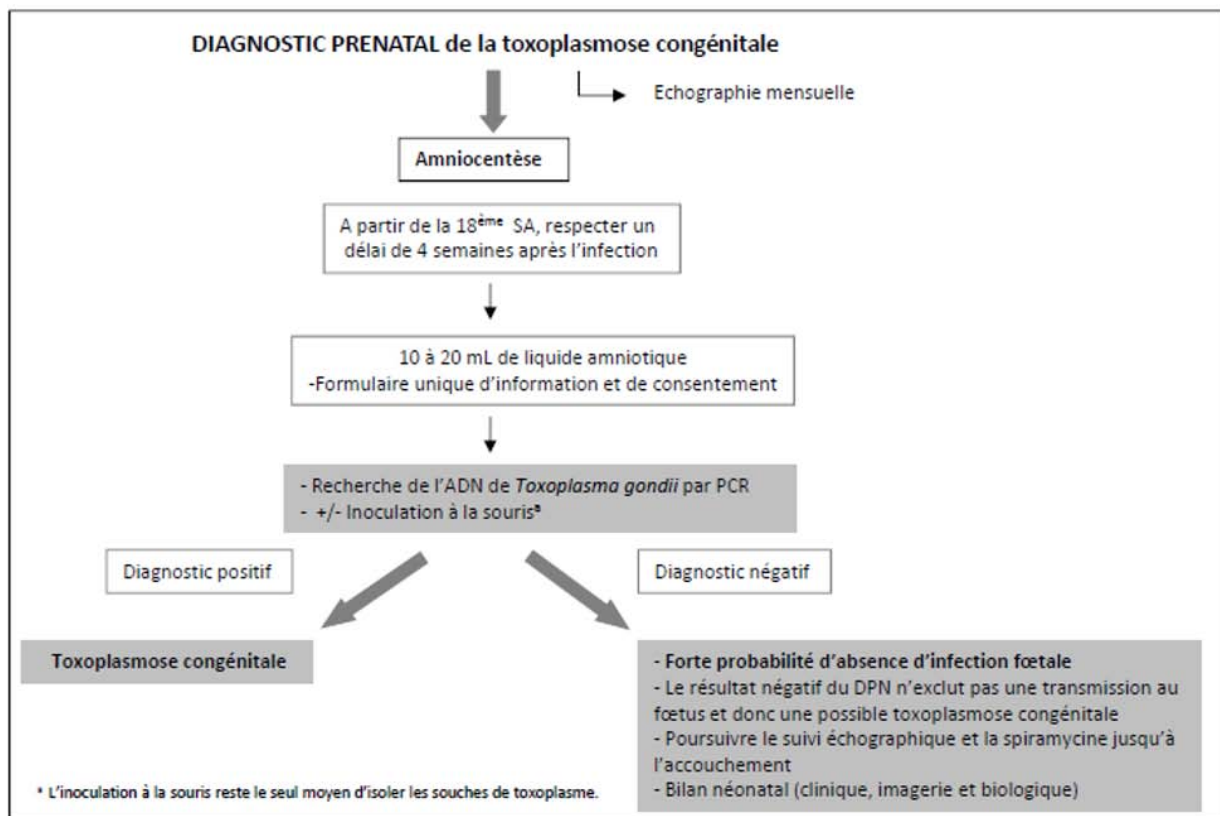


Figure 32: « Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale » (75).

5.1.2. Diagnostic prénatal par imagerie

Une surveillance par échographie mensuelle est mise en place dès la séroconversion toxoplasmique maternelle confirmée ; dans le cas où les résultats de l'amniocentèse révèlent une contamination du liquide amniotique par *T. gondii*, des échographies seront alors réalisées tous les 15 jours pour mettre en évidence une éventuelle fœtopathie toxoplasmique (80). L'anomalie échographique le plus fréquemment retrouvée dans les toxoplasmoses congénitales est l'hydrocéphalie (81). Les autres signes échographiques d'une probable infection fœtale sont les suivants : image de placentite se traduisant par une augmentation de l'épaisseur du placenta associée à une hyperéchogénicité, dilatation des ventricules cérébraux, calcifications intracrâniennes, parfois épanchements des séreuses (péritonéal, péricardique, pleural) et retard de croissance intra utérin (70,71).

L'échographie prénatale est un examen fiable mais sa normalité n'exclut pas une atteinte du fœtus ; en revanche, l'IRM fœtale est actuellement le meilleur examen pour déterminer une potentielle atteinte cérébrale mais à l'heure actuelle aucune imagerie ne permet de mettre en évidence une

toxoplasmose oculaire ; le risque de chorioretinite est cependant plus important s'il y a des lésions cérébrales (84).

Seuls les cas d'infection toxoplasmique fœtale associée à des anomalies sévères à l'imagerie peuvent avoir recours à l'interruption médicale de grossesse (80). Durant l'année 2016, parmi les 192 cas de toxoplasmose congénitale déclarés, 2 cas ont donné lieu à une interruption médicale de grossesse (2).

5.2. Diagnostic néonatal (DNN)

Il est fait chez tous les nouveau-nés dont la mère a fait une séroconversion toxoplasmique au cours de la grossesse ou en période péri-conceptionnelle afin de dépister les éventuels faux négatifs du diagnostic prénatal et les cas de transmissions materno-fœtales tardives ou de faire un diagnostic si le diagnostic prénatal n'a pas pu être fait. Ce diagnostic repose sur plusieurs éléments (85) :

- Un examen clinique recherchant des troubles neurologiques, une macrocéphalie, et une hépatosplénomégalie
- Un fond d'œil afin de mettre en évidence une éventuelle chorioretinite
- Une échographie transfontanellaire qui dépisterait des calcifications intracrâniennes et/ou une hydrocéphalie
- Un diagnostic parasitologique reposant sur la recherche de *T. gondii* dans le sang de cordon et/ou sur placenta soit par la technique d'inoculation à la souris soit par une technique de PCR
- Une sérologie toxoplasmose sur sang de cordon détectant les IgA, IgM et IgG spécifiques.

5.2.1. Etude sérologique

Concernant la sérologie sur sang de cordon, seuls les tests reposant sur une technique d'immunocapture (ISAGA) peuvent être pratiqués dans cette indication du fait de leur plus grande sensibilité (84). S'il y a détection d'IgM ou IgA, leur présence doit être confirmée à 10-15 jours de vie sur un prélèvement de sang du nouveau-né, ces anticorps pouvant provenir de la mère (transmission lors de l'accouchement). La confirmation de la présence d'IgM ou d'IgA pose le diagnostic de toxoplasmose congénitale ; par contre, l'absence de détection d'IgM et d'IgA n'exclut pas une atteinte fœtale : il peut s'agir d'une contamination de la mère en tout début de grossesse (perte de détection des IgM et IgA synthétisées) ou d'une contamination fœtale en toute fin de grossesse (IgM et IgA pas encore synthétisées).

Le recours à des techniques complémentaires comme le Western Blot permet de mettre en évidence une synthèse d'IgG et/ou d'IgM par le nouveau-né ; en effet, une analyse des profils comparés

mère/enfant va permettre de faire la différence entre les anticorps de la mère et ceux de l'enfant : les bandes obtenues sur le sérum de la maman et celui du nouveau-né sont comparées ; la mise en évidence d'IgM et/ou IgG synthétisés par le nouveau-né en comparaison au profil immunologique de la mère est la preuve formelle d'une toxoplasmose congénitale (Figure 33).

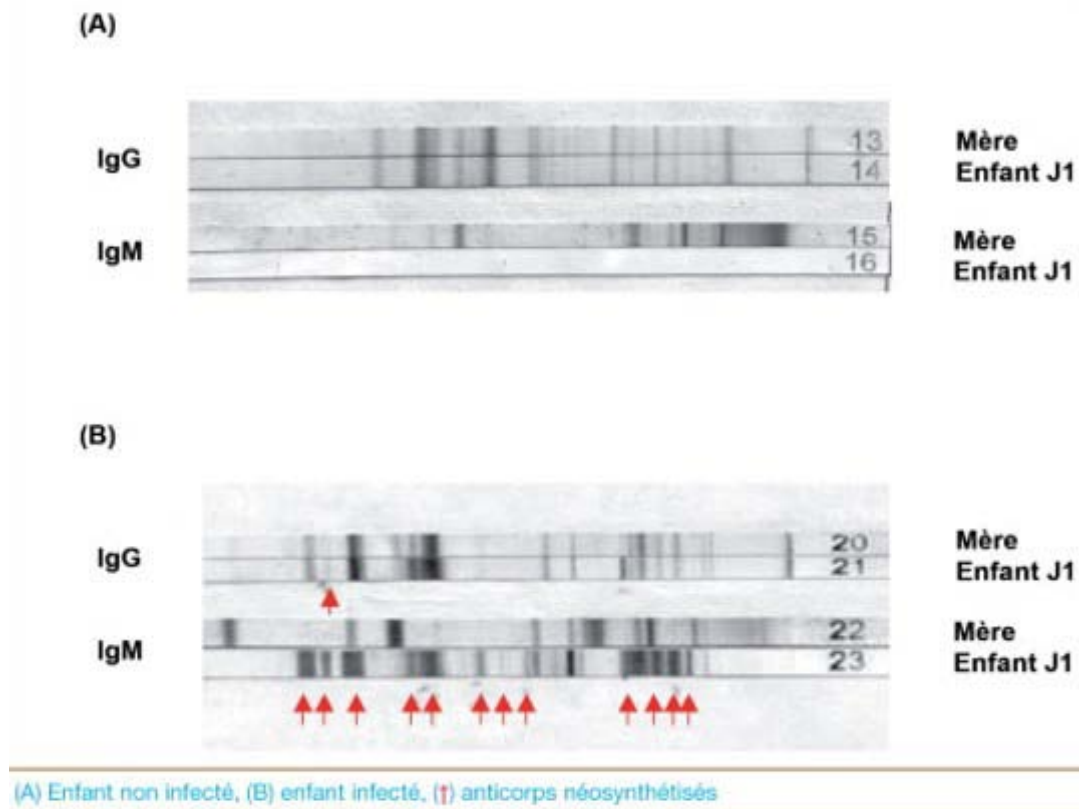


Figure 33 : Profils immunologiques comparés sang maternel/sang du nouveau-né par la technique Western Blot pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale (86).

5.2.2. Mise en évidence du toxoplasme

Concernant le diagnostic parasitologique qui repose sur la recherche de *T. gondii* dans le sang de cordon et/ou sur placenta, il se fait soit par la technique d'inoculation à la souris soit par une technique de PCR.

L'inoculation de placenta à des souris (87) consiste à inoculer un volume de 200 µL à 1 mL de placenta prétraité et mixé dans 2 à 6 souris par voie intrapéritonéale puis une sérologie toxoplasmique des souris inoculées est réalisée 4 à 6 semaines après. En cas de séroconversion avérée, une recherche de kystes parasitaires cérébraux chez la souris permet de confirmer l'infection du placenta.

La recherche d'ADN toxoplasmique par PCR consiste à extraire l'ADN à partir du culot de placenta préparé (200 µL à 1 mL) puis à amplifier un fragment d'ADN spécifique de *T. gondii* ; les méthodes utilisées font appel à une lyse cellulaire par la protéinase K suivie d'une extraction de

l'ADN à l'aide d'un kit ; la séquence d'ADN spécifique de *T. gondii* est ensuite amplifiée ; au minimum, 2 PCR sont réalisées par extraction (87).

La mise en évidence de *T. gondii* dans le placenta n'est pas synonyme de toxoplasmose congénitale ; en effet, quelques cas de placentite sans transmission materno-fœtale du parasite ont été rapportés (88). En revanche, la détection du parasite dans le sang de cordon et/ou dans le liquide amniotique prélevé à la naissance confirme le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

5.3. Diagnostic post-natal

Il permet de confirmer ou d'exclure une toxoplasmose congénitale lorsque les diagnostics anténatals et néonataux sont négatifs ou n'ont pas été faits. Ce bilan post-natal est réalisé chez l'enfant en effectuant sur sang périphérique (89) :

- la recherche d'IgM et/ou d'IgA
- la recherche d'une néosynthèse d'IgG et/ou d'IgM par comparaison des profils mère-enfant mais cette analyse est limitée à 1 mois pour les IgM et trois mois pour les IgG devant le risque de détecter des anticorps naturels ; en général cette recherche s'effectue sur sang de cordon ou prélèvement périphérique du nouveau-né à J3
- un suivi du taux d'IgG spécifiques, mesuré entre J0 et J3, à J15 et J30 puis tous les mois jusqu'à négativation des anticorps qui affirme l'absence d'infection congénitale

Une sérologie négative avant l'âge d'un an et en l'absence de traitement permet d'éliminer le diagnostic de toxoplasmose congénitale. A l'inverse, une persistance voir une augmentation des IgG spécifiques dans la première année de vie permet de confirmer une toxoplasmose congénitale.

Avec l'association des diagnostics prénatal et néonatal, on diagnostique 90% des toxoplasmoses congénitales avant la fin du 1^{er} mois et 95% avant la fin du 3^{ème} mois (90). En 2016, sur les 192 cas de toxoplasmose congénitale, 70 ont été diagnostiquées en période anténatale et 122 en période post-natale (Figure 34).

Effectif	
Diagnostic en période anténatale	70
Diagnostic en période postnatale	122
Total	192

Figure 34: « Effectif des cas de TC diagnostiqués en France entre le 1er janvier et le 31 décembre 2016 »(2).

6. Données épidémiologiques pronostiques

6.1. Létalité

D'après les données du réseau TOXOSURV, entre 2007 et 2016, le taux de mortalité annuel varie entre 2 et 9,4% chez les individus atteints de toxoplasmose congénitale (Tableau 1) ; cela comprend les IVG et IMG, les MFIU et les décès post-nataux.

Année	TC diagnostiquées	Létalité parmi les cas de TC	Pourcentage de létalité parmi les cas de TC
2007	272	11	4%
2008	268	16	5,9%
2009	266	25	9,4%
2010	244	12	4,9%
2011	186	5	2,7%
2012	204	13	6,4%
2013	179	9	5%
2014	216	7	3,2%
2015	246	5	2%
2016	192	5	2,6%

Tableau 1: Mortalité parmi les cas de toxoplasmose congénitale entre 2007 et 2016 (64).

6.2. Morbidité

Entre 2007 et 2016, les données de TOXOSURV indiquent entre 7,3 et 11,6% de cas de toxoplasmose congénitale symptomatiques à la naissance parmi les enfants nés avec une TC et on dénombre entre 1,2 et 5,2 % de formes sévères parmi les cas de TC à la naissance (Tableau 2).

Année	TC à la naissance	TC symptomatiques à la naissance (pourcentage parmi les cas de TC à la naissance)	TC avec formes sévères à la naissance (pourcentage parmi les cas de TC à la naissance)
2007	234	27 (11,5%)	8 (3,4%)
2008	233	28 (11,6%)	8 (3,4%)
2009	228	25 (11%)	8 (3,5%)
2010	207	18 (8,7%)	5 (2,4%)
2011	173	26 (15%)	9 (5,2%)
2012	176	15 (8,5%)	7 (4%)
2013	165	17 (10,3%)	5 (3%)
2014	205	14 (7,3%)	4 (2%)
2015	225	20 (8,7%)	5 (2,2%)
2016	172	15 (8,7%)	2 (1,2%)

Tableau 2: Morbidité liée à la TC entre 2007 et 2016 (64).

6.3. Pronostic visuel

Le principal risque oculaire est celui de survenue ultérieure de chorioretinite ; cette atteinte ophtalmologique non prévisible peut survenir quelle que soit la date de la contamination maternelle (91). D'après les cas déclarés au sein du réseau TOXOSURV entre 2010 et 2016, on dénombre entre 2,3% et 6,9% cas de chorioretinites à la naissance parmi les cas de TC à la naissance (Tableau 3).

Année	TC à la naissance	Choriorétinites à la naissance (pourcentage parmi les cas de TC à la naissance)
2010	207	9 (4,3%)
2011	173	12 (6,9%)
2012	176	4 (2,3%)
2013	165	8 (4,8%)
2014	205	7 (3,4%)
2015	225	7 (3%)
2016	176	4 (2,3%)

Tableau 3: Cas de choriorétinites à la naissance parmi les cas de TC à la naissance entre 2010 et 2016 (64).

Plusieurs études de suivi ophtalmologique des enfants atteints de toxoplasmose congénitale ont été réalisées et montrent que quelle que soit la durée du traitement utilisé, 20% avaient au moins une lésion oculaire sur un suivi de 5 ans (92) et 30% au moins une lésion choriorétinienne sur un suivi d'au moins 10 ans (93,94). L'instauration précoce d'un traitement, *in utero* ou dès la naissance, n'empêche pas l'apparition d'une choriorétinite mais réduit ce risque et la quasi-totalité de ces atteintes visuelles s'observent avant l'âge de 10 ans (95). Toutes ces données sur le pronostic visuel expliquent la nécessité d'une surveillance régulière reposant sur la réalisation d'un fond d'œil à la naissance puis tous les 3 mois jusqu'à l'âge de 2 ans, tous les 6 mois la troisième année puis une fois par an à vie (80). Les principaux facteurs de risque d'apparition d'une choriorétinite sont la prématurité < 32 SA, le retard au diagnostic, la précocité de l'infection chez la mère et la présence de manifestations cliniques non oculaires à la naissance (96). L'éducation parentale sur les signes d'alerte est également très importante. Le pronostic des choriorétinites lorsqu'un traitement est instauré est bon dans la plupart des études (95,97).

7. Traitement

7.1. Médicaments utilisés

Les traitements médicamenteux sont uniquement actifs sur les tachyzoïtes donc sans effet sur les kystes de *T. gondii*. On différencie deux grandes familles de molécules :

- Les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique qui entraînent une carence en folates responsable d'un trouble de la synthèse des bases puriques (adénine et guanine) et donc d'une altération de la division des cellules ; on distingue :
 - La pyriméthamine (Malocide®) qui inhibe la dihydrofolate réductase (DHFR) et dont l'utilisation nécessite une supplémentation en acide folique
 - Les sulfamides qui inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) : sulfadiazine (Adiazine®) et sulfadoxine

Ces deux familles de molécules se retrouvent dans des associations médicamenteuses qui ont l'avantage de diminuer les doses de chaque molécule et d'en réduire ainsi la toxicité : l'association de pyriméthamine + sulfadiazine est la plus efficace et la plus utilisée contre *T. gondii*.

- Les macrolides notamment la spiramycine (Rovamycine®) sont des antibiotiques avec un effet antiparasitaire dont l'action ne s'observe qu'à une concentration élevée pouvant être atteinte uniquement dans certains organes (foie, poumon, placenta); leur intérêt est moindre dans les formes graves cérébrales et oculaires. La spiramycine est une molécule bien tolérée et non tératogène dont l'utilisation diminue le risque de transmission materno-fœtale du parasite de 50 % à 60 % (1).

7.2. Traitement de la femme enceinte

Un traitement anténatal préventif est mis en place sans délai chez toute femme enceinte suspecte d'infection toxoplasmique dans le but de diminuer le risque de transmission du parasite au fœtus ; il comporte l'administration de spiramycine par voie orale jusqu'à la fin de la grossesse (9 millions d'unités /jour en 3 prises). L'administration d'un traitement curatif par l'association pyriméthamine + sulfamide n'est indiquée que si la contamination du fœtus est prouvée par le diagnostic anténatal ; le traitement se fait en continu jusqu'à l'accouchement par pyriméthamine (Malocide® 1 cp à 50 mg / jour) + sulfadiazine (Adiazine® 6 cp à 500 mg / jour en 2 prises) associé à une supplémentation par acide folinique (Folinoral 25® 2 gélules à 25 mg par semaine).

Dans le cas particulier d'une séroconversion tardive, à partir de 33 SA, la réalisation d'un diagnostic anténatal impliquant la réalisation d'une amniocentèse est souhaitable car un résultat positif permettra de traiter le nouveau-né dès la naissance ; en revanche si l'amniocentèse n'est pas

réalisable, certaines équipes mettent en place un traitement selon le protocole pyriméthamine + sulfadiazine jusqu'à l'accouchement car le taux de transmission materno-fœtale à cet âge gestationnel est élevé (80).

Une récente étude française a permis de comparer dans le cadre du protocole Toxogest le traitement prénatal par pyriméthamine + sulfadiazine au traitement par spiramycine dans la réduction de la transmission materno-fœtale de la toxoplasmose après une séroconversion maternelle ; le taux de transmission était de 18,5% dans le groupe pyriméthamine + sulfadiazine versus 30% dans le groupe spiramycine ; aucune anomalie cérébrale n'a été détectée dans le groupe pyriméthamine + sulfadiazine contre 8,6% dans le groupe spiramycine ; malgré ces résultats en faveur du traitement par pyriméthamine + sulfadiazine, la différence n'est pas significative en raison du faible nombre de patientes incluses.

7.3. Prise en charge du nouveau-né et suivi

Lorsque le diagnostic de toxoplasmose congénitale est posé, cela impose un traitement curatif de l'enfant même si l'infection n'est pas symptomatique ; son intérêt est de diminuer la fréquence et la gravité des séquelles à long terme, notamment les chorioretinites. L'association de pyriméthamine et de sulfamide pendant un an est le traitement de référence : Malocide® (1 mg / kg / jour en 1 prise pendant 2 mois puis 0.5 mg/kg / jour) + Adiazine® (100 mg / kg / jour en 2 prises) associé à du Folinoral 25® (1 gélule à 25 mg 2 fois par semaine en débutant le jour du traitement) (80). En revanche, chez les nouveau-nés pour lesquels il n'y a pas d'argument en faveur d'une toxoplasmose congénitale, l'abstention thérapeutique est préconisée. Si le diagnostic finit par être établi lors du suivi sérologique, les enfants seront traités selon les mêmes modalités thérapeutiques. Les enfants traités durant leur première année de vie ne synthétisent pas ou très peu d'anticorps pouvant conduire à une sérologie faussement négative à l'âge de un an ; en revanche, à l'arrêt du traitement on observe fréquemment des rebonds sérologiques mais sans conséquence clinique ; cela se traduit par une augmentation des IgG et/ou la détection d'IgM et/ou d'IgA spécifiques (98).

2^{ème} partie : ETUDE EXPERIMENTALE

Mise au point d'une technique d'extraction et de PCR
en temps réel à partir de placenta dans l'aide au
diagnostic de la toxoplasmose congénitale

INTRODUCTION

Le laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes est un centre expert concernant le diagnostic biologique de la toxoplasmose. Cette expertise intervient notamment pour confirmer et dater une séroconversion toxoplasmique lors d'une grossesse, pour réaliser un suivi sérologique des nourrissons suspects de toxoplasmose congénitale mais aussi pour mettre en évidence *Toxoplasma gondii* dans divers prélèvements afin d'aider au diagnostic de toxoplasmose congénitale.

Actuellement au CHU de Nantes, la technique utilisée pour détecter *T. gondii* dans le placenta est une technique d'inoculation à la souris ; mais cette méthode, techniquement longue, éthiquement discutable et avec un temps de rendu de résultats de plusieurs semaines est aujourd'hui amenée à ne plus être utilisée en routine.

Il est donc important de mettre au point une technique de biologie moléculaire sur placenta afin d'extraire et d'amplifier par PCR en temps réel l'ADN de *T. gondii*, ce qui en cas de positivité serait un argument en faveur du diagnostic de toxoplasmose congénitale. Cette technique aurait l'avantage de rendre un résultat dans des délais beaucoup plus brefs et d'éviter l'utilisation des animaux de laboratoire dans un but diagnostique.

L'objectif du travail de cette thèse est donc la mise au point d'une technique d'extraction et d'amplification de l'ADN de *T. gondii* à partir d'échantillons de placentas pré-traités.

I. Echantillons et méthodes

1. Placentas

Les échantillons utilisés pour la mise en place de la technique ont été préalablement traités dans un but d'inoculation à la souris. Les placentas proviennent de femmes ayant fait une séroconversion toxoplasmique durant leur grossesse entre avril 2008 et août 2017. L'ensemble de ces placentas ont déjà été inoculés à la souris (diagnostic de routine) afin de mettre en évidence une éventuelle contamination du placenta par les toxoplasmes.

Les placentas (ni congelés, ni formolés) ont été conservés à 4°C avant leur transmission au laboratoire. Cent grammes de placentas, prélevés à différents endroits, ont été lavés avec environ 300 mL de liquide de Hanks. Le placenta a ensuite été broyé au blender. Deux cent millilitres de trypsine en milieu de Hanks ont été ajoutés au broyat pour obtenir une concentration finale à 2,5 µg/mL ainsi que deux millilitres d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). La préparation a ensuite été incubée au moins 2 h dans un bain-marie à 37°C sous agitation (180-200 rpm) avant d'être défibrinée au travers d'un tamis. Le filtrat a été récupéré dans un bécher puis a été centrifugé

à 4°C pendant 20 minutes. Le culot obtenu a été lavé à l'eau physiologique stérile et de nouveau centrifugé à 4°C pendant 20 minutes. Cette dernière étape a été répétée jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Au minimum 9 mL du lysat de placenta ont été transférés dans un flacon stérile avant d'être inoculé aux souris. Un aliquot de chaque placenta ainsi traité a été congelé à -20°C.

2. Inoculation à la souris

Il s'agit de la technique actuellement utilisée au laboratoire pour mettre en évidence *T. gondii* dans le placenta. Six souris ont été inoculées par placenta. L'injection a été réalisée en intrapéritonéal après désinfection de l'abdomen : trois souris ont été inoculées avec 1 mL et 3 autres avec 2 mL de placenta. Les animaux ont ensuite été surveillés quotidiennement pendant quatre semaines jusqu'à réalisation de la sérologie toxoplasmose à partir d'une goutte de sang prélevée au niveau de la veine caudale. Cette sérologie a été déterminée par une technique d'agglutination directe sensibilisée qui détecte les IgG anti-toxoplasmes éventuellement produites par la souris, après destruction des IgM par un traitement au 2-mercaptoéthanol (Toxoscreen BioMérieux, Marcy l'Etoile) : plusieurs dilutions du sérum de souris sont réalisées puis incubées dans des puits contenant des tachyzoïtes formolés. Une lecture visuelle des puits a ensuite été réalisée. L'apparition d'un voile d'agglutination indiquait la présence d'anticorps anti-toxoplasmes ; la sédimentation correspondait à une absence d'anticorps. Si cette sérologie était positive cela signifiait que le placenta inoculé était infecté par *T. gondii*.

Parmi les 94 échantillons de placentas testés, 48 étaient positifs avec la technique d'inoculation à la souris, 44 étaient négatifs et 2 échantillons étaient négatifs à l'inoculation mais un diagnostic de toxoplasmose congénitale a été posé en période post-natale (Annexe 1).

3. Extraction

3.1. Présentation de l'extracteur

La mise au point de la technique a été faite avec l'extracteur d'acides nucléiques Maxwell® Rapid Sample Concentrator (RSC) (Figure 35). L'automate permet de réaliser une purification automatisée des acides nucléiques à partir de divers types d'échantillons et peut réaliser jusqu'à 16 extractions en même temps. Il est contrôlé via une interface utilisateur fonctionnant sur une tablette PC et a la capacité d'enregistrer des données.

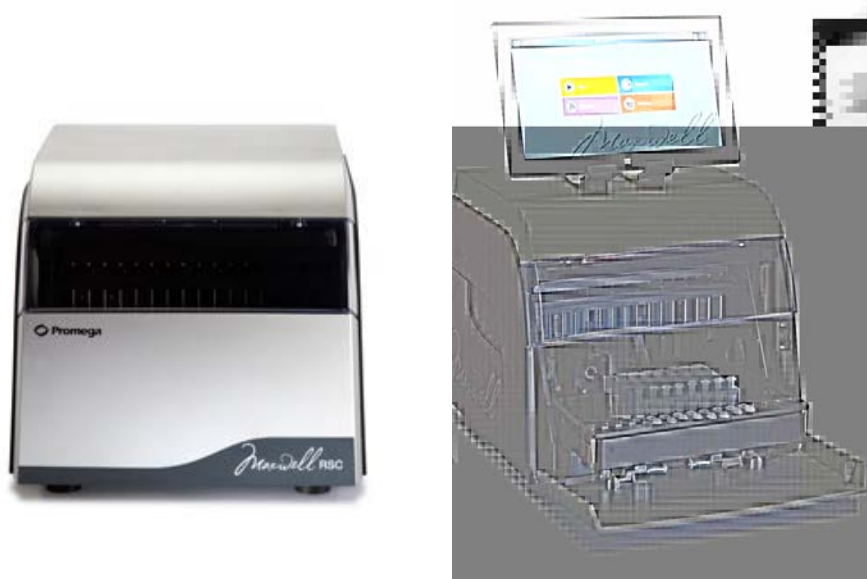


Figure 35: Automate Maxwell® RSC.

3.2. Principe de l'extraction

La technique d'extraction de l'ADN par l'automate Maxwell® RSC repose sur le principe de liaison des acides nucléiques à des particules paramagnétiques : un barreau magnétique recouvert d'une gaine en plastique (plongeur) permet de déplacer des microbilles aimantées de puits en puits et ainsi d'isoler l'ADN du reste de l'échantillon.

L'extraction d'ADN se fait en plusieurs étapes (99) : une première phase de lyse chimique des échantillons avec un tampon de lyse (à l'extérieur de l'automate); la deuxième étape correspond à la purification de l'ADN sur l'extracteur (Figure 36). L'utilisateur sélectionne le protocole approprié au kit utilisé et prépare le rack de l'appareil (positionnement des cartouches, dépôt des échantillons, installation des plongeurs, mise en place des tubes d'élution et ajout du tampon d'élution), avant de replacer le portoir dans l'automate (Annexe 2) ; après liaison de l'ADN aux particules magnétiques, l'ADN est purifié au cours de lavages successifs ; la dernière étape correspond à l'élution.

L'éluât contenant l'ADN a été congelé en attendant l'amplification par PCR. A chaque série d'extraction, un témoin négatif a été réalisé avec les mêmes étapes mais sans échantillon de placenta au départ.

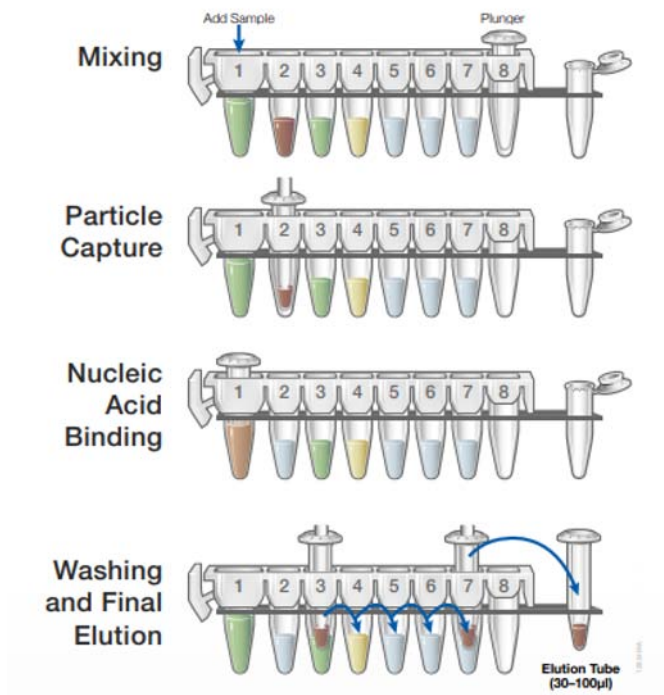


Figure 36: Principe de fonctionnement de l'extracteur Maxwell® RSC : un barreau magnétique recouvert d'une gaine en plastique déplace les particules paramagnétiques de puits en puits(3).

4. PCR

4.1. Principe de la PCR temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (polymerase chain reaction) est une technique de biologie moléculaire d'amplification d'une séquence nucléotidique. Elle permet à partir d'amorces spécifiques une duplication exponentielle d'une séquence ciblée d'ADN ou d'ARN spécifique d'un gène appelée amplicon. Cette méthode repose sur les propriétés de synthèse des ADN polymérases, capables de synthétiser de l'ADN à partir d'un simple brin d'ADN et la capacité d'hybridation et de déshybridation des brins d'ADN complémentaires en fonction de la température (100). On utilise une ADN polymérase thermo-tolérante, la Taq polymérase. Ces propriétés permettent, grâce à des transitions cycliques de température effectuées dans un thermocycleur, de contrôler l'activité enzymatique de la Taq polymérase. La PCR est donc basée sur la répétition de cycles de transition de température dans le but d'amplifier une séquence d'ADN spécifique d'un gène.

La PCR se déroule en plusieurs étapes (Figure 37) (101): lors de l'étape 0 à température ambiante, l'ADN double brin prend sa conformation en double hélice ; l'étape 1 correspond à la dénaturation de l'ADN : c'est une étape de chauffage à 95°C qui permet de séparer les deux brins d'ADN et de dénaturer d'autres enzymes possiblement présentes dans la solution ; l'étape 2 permet l'appariement

des amorces : les amorces « sens » et « anti-sens » s'hybrident à l'ADN matrice grâce à une température favorable, fonction de la séquence de l'amorce (56-64°C) ; deux polymérases peuvent alors interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice ; l'étape 3 est celle de l'élongation : cette phase à 72°C permet la synthèse du brin complémentaire de l'ADN matrice par la Taq polymérase à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel ; les Taq polymérases s'arrêtent à la fin du cycle, décrochées par la phase de dénaturation du cycle suivant (100). C'est ainsi que s'enchainent les cycles avec une augmentation exponentielle de la quantité d'ADN amplifiée.

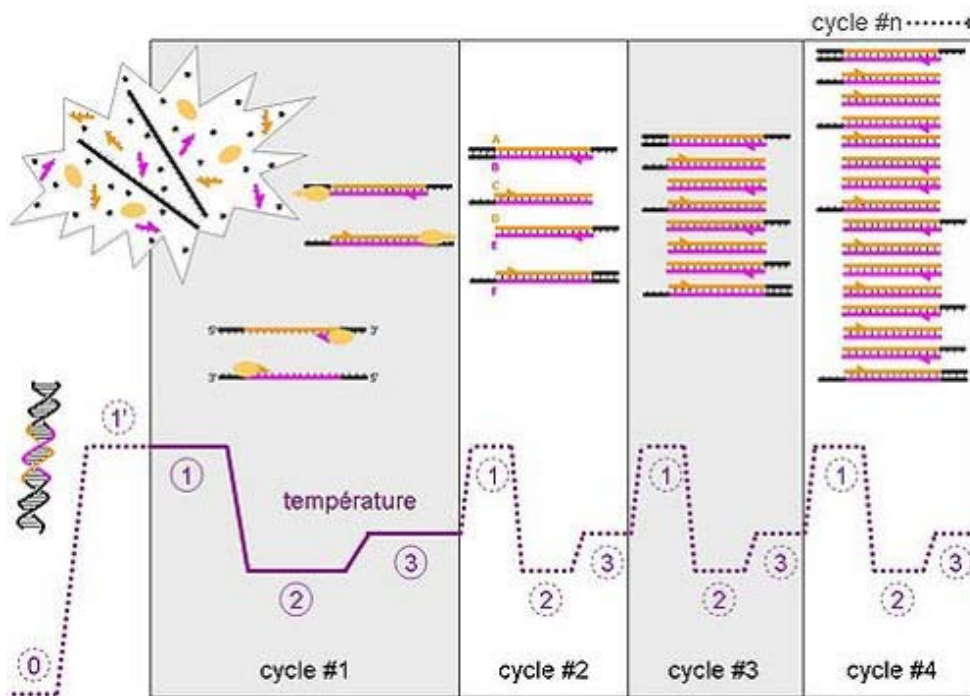


Figure 37: Les différentes étapes de la PCR (101).

La PCR en temps réel réalise en même temps les phases d'amplification et de détection des produits amplifiés à chaque cycle; dans notre étude nous utilisons un système de détection basé sur l'hydrolyse de sondes marquées, appelées sondes Taqman. Un premier fluorophore appelé donneur ou reporter émet de l'énergie qui est absorbée par un deuxième fluorophore appelé bloqueur ou quencher qui absorbe l'énergie émise (102). Lorsque les deux fluorophores sont proches, aucune fluorescence n'est émise ; durant la phase d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase, l'hydrolyse de la sonde fixée sur l'ADN va éloigner le reporter et le quencher permettant au reporter d'émettre un signal fluorescent (Figure 38). L'intensité de la fluorescence mesurée est donc proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée.

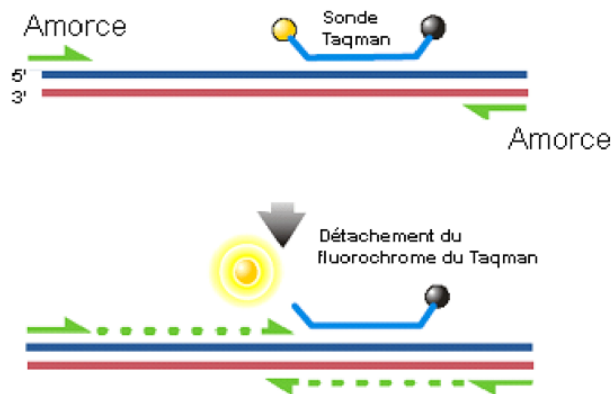


Figure 38: Principe de l'émission de fluorescence par la sonde Taqman (7).

Cette technique de PCR en temps réel nécessite un thermocycleur couplé à un système de lecture optique qui mesure la fluorescence. Dans le thermocycleur, une source lumineuse excite le fluorophore émetteur. Le signal de fluorescence émis, est récupéré et transmis à un ordinateur possédant un logiciel d'analyse et d'enregistrement des données(103). Le cycle seuil ou threshold cycle (Ct) correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent soit supérieur à la ligne de base donc différent du bruit de fond (Figure 39).

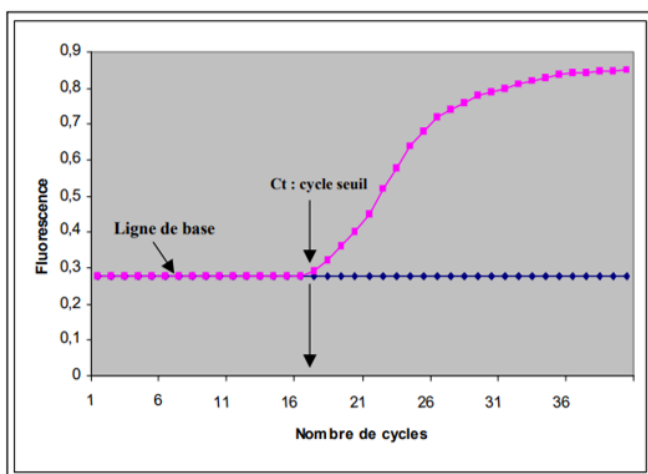


Figure 39: « Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles » (103).

La technique de PCR en temps réel est de plus en plus utilisée en routine ; en effet elle se révèle être très sensible et spécifique, reproductible et surtout rapide (104).

Le thermocycleur utilisé au cours des expérimentations est le Rotor-Gene Q (Qiagen) dont la source lumineuse permettant l'excitation des fluorophores est une diode électroluminescente (Figure 40).

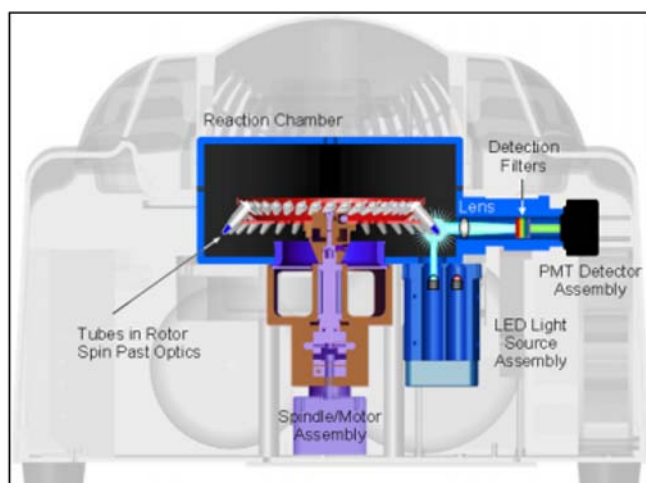


Illustration of the optical system.

Figure 40: Fonctionnement du système optique du Rotor-Gene Q (Rotor-Gene Q User Manual)(105).

4.2. Kit de détection de *T. gondii*

Nous avons utilisé un coffret de PCR en temps réel commercialisé par Bio-Evolution qui amplifie la séquence nucléotidique REP 529, spécifique du parasite *T. gondii* et répété 200 à 300 fois dans le génome. Un contrôle interne d'inhibition est fourni ainsi qu'un contrôle positif du gène cible de *T. gondii* à la concentration de 200 équivalents génomes de toxoplasmes / μ L. Le mélange « Mix » contient les nucléotides tri-phosphates, l'ADN polymérase, les amorces, les sondes Taqman et du chlorure de magnésium nécessaires à la réaction d'amplification. Le mélange « control intern » est un système permettant de détecter les éventuels inhibiteurs d'amplification. Chaque coffret permet de réaliser 25 tests et le contenu est détaillé dans le Tableau 4.

Réactifs	Quantité
Mix	475 μ L
MG Water	500 μ L
Contrôle positif (200 eq. TG/ μ L)	30 μ L
Contrôle interne	30 μ L

(eq. TG : équivalent à 200 génomes de Toxoplasme/ μ L)

Tableau 4: Contenu du Kit de PCR *T. gondii* Bio-Evolution (106).

Une première étape, réalisée en salle de pré-PCR, correspond à la reconstitution du mélange réactionnel dans un tube Eppendorf : l'équivalent de 19 μ L de Mix *T. gondii* auquel est ajouté 1 μ L de contrôle interne pour chaque tube de PCR; 20 μ L de cette solution est déposé dans chaque tube de PCR. La deuxième étape consiste à déposer 5 μ L d'ADN, provenant des échantillons ou du contrôle positif, ou de l'eau pour le témoin négatif. Chaque échantillon est déposé en double.

4.2.1. Détection de *Toxoplasma gondii*

La sonde spécifique de la cible REP 529 est marquée par le fluorophore FAM qui va émettre une fluorescence si elle est hydrolysée lors de l'amplification; en effet ce fluorophore émetteur sera éloigné du marqueur d'extinction de fluorescence BHQ1. La détection de l'ADN amplifié de *T. gondii* est faite en utilisant le canal GREEN. Pour chaque série de PCR *Toxoplasma*, sont déposés deux témoins positifs de *T. gondii* correspondants à 20 et 0,2 équivalents génomes de toxoplasmes / μ L (TG/ μ L). Les cycles de température sont détaillés dans le Tableau 5. L'acquisition de la fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)
Activation ADN polymérase	95°C	15 min	1
Amplification	95°C	15 sec	40
	60°C	60 sec	
Refroidissement	37°C	1 sec	1

Tableau 5: Cycles de température dans le thermocycleur pour la PCR *Toxoplasma* (106).

4.2.2. Détection des inhibiteurs de PCR

Afin de s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de la PCR, un contrôle interne d'inhibition est fourni dans le coffret ; il s'agit d'un gène exogène qui est amplifié en même temps que le gène cible du parasite : s'il est amplifié correctement, cela signifie qu'il n'y a pas d'inhibiteurs de PCR dans le milieu réactionnel et que le résultat peut être interprété. La sonde spécifique de ce contrôle interne est marquée par un autre fluorophore appelé HEX et émet une fluorescence lors de son hydrolyse pendant l'amplification du gène du contrôle interne. La détection de cet ADN amplifié va se faire dans le canal Yellow.

4.2.3. Interprétation des résultats

Les critères de validation de la PCR sont :

- Canal Yellow : Ct compris entre 28 et 31 pour le témoin négatif et le témoin d'extraction
- Canal Green : positivité des témoins positifs TG dans les valeurs attendues (spécifiées par le fournisseur pour chaque lot) ; négativité du témoin négatif et du témoin d'extraction

Les résultats sont interprétés de la façon suivante:

- Echantillon positif : amplification sur le canal Green (*T. gondii*) et amplification sur le canal Yellow (le signal peut être affecté en cas de quantités importantes d'ADN de *T. gondii*). L'échantillon de placenta contient de l'ADN de *T. gondii*.

- Echantillon négatif : s'il n'y a aucun signal sur le canal Green et que le signal est correct sur le canal Yellow, l'échantillon est considéré comme négatif, le placenta ne contient pas d'ADN du parasite.
- Echantillon non interprétable : Si aucun signal n'est détecté, ni sur le canal Green ni sur le canal Yellow, on ne peut rien conclure, la réaction d'amplification d'ADN n'a pas fonctionné correctement.

4.3. PCR Albumine

L'intérêt de la PCR albumine est de valider le bon déroulement de l'extraction d'ADN. Son principe repose sur l'amplification d'un fragment de 74 paires de base du gène de l'albumine humaine par PCR en temps réel à l'aide d'amorces et d'une sonde Taqman (Tableau 6). Il s'agit d'une technique non commercialisée. La première étape consiste à préparer le MIX d'amplification en mélangeant le Pré Mix (Pré Mix TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Thermo Fisher Scientific), les amorces ALB1, ALB2, la sonde ALBS dont les séquences sont détaillées dans le Tableau 6 et de l'eau ultra pure de manière à ce que chaque tube de PCR contienne 12,5 µL de Pré Mix, 1,25 µL de chaque amorce ALB1 et ALB2, 0,5 µL de la sonde ALBS et 4,5 µL d'eau pure; 20 µL de ce mélange sont déposés dans chaque tube de PCR. Dans un deuxième temps on va déposer dans les tubes PCR, 5 µL d'éluat d'ADN pour chaque patient, 5µL d'eau pure pour le témoin négatif et 5 µL de chaque concentration de la gamme albumine correspondants à 20, 200, 2000 et 20000 copies/µL pour les témoins positifs. La détection de la fluorescence va se faire sur le canal RED du thermocycleur. La présence d'albumine dans les extraits d'ADN associée à la positivité des points de gamme albumine permet de valider le bon déroulement de l'extraction.

		Séquence nucléotidique
Amorce 1	ALB1	5'GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT 3'
Amorce 2	ALB2	5' AAATCATGGGAGCTGCTGGTT 3'
Sonde	ALBS	5'CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC 3'

Tableau 6: Les séquences des amorces et de la sonde Taqman utilisées pour la PCR albumine (107).

II. Résultats

1. Mise au point de la technique d'extraction

Les différentes étapes permettant d'extraire l'ADN ont été optimisées afin d'avoir une bonne sensibilité de la technique, en évitant la présence d'inhibiteurs et en minimisant le coût des réactifs.

1.1. Choix du kit

Plusieurs kits ont été testés: Maxwell® RSC Blood DNA Kit, Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit et RSC Pure Food Pathogen, tous les trois utilisables avec l'extracteur Maxwell.

Des premiers essais ont permis de comparer les kits RSC Blood DNA et RSC Cultured Cells DNA. A partir de 3 échantillons de placentas, plusieurs protocoles de préparation des échantillons ont été réalisés, en faisant varier le volume de placenta, le volume de tampon de lyse et le volume de protéinase K (Tableau 7).

N° protocole	N° échantillon	Résultat de l'inoculation souris	Volume de placenta (en µL)	Volume tampon de lyse (en µL)	Volume protéinase K (en µL)	Nombre de répétitions
1	84	POSITIVE	50	400	40	2
2	84	POSITIVE	100	400	40	2
3	84	POSITIVE	150	400	40	2
4	92	NEGATIVE*	1000	5000	500	1
5	91	NEGATIVE	750	5000	500	1
6	91	NEGATIVE	250	5000	0	1

Tableau 7: Protocoles de préparation des échantillons. (* inoculation négative mais diagnostic de TC)

Toutes ces préparations ont été placées au bain marie à 56°C pendant toute une nuit. Plusieurs extractions ont été réalisées à partir des protocoles précédents; le volume soumis à extraction est détaillé dans le Tableau 8.

N° extraction	Kit d'extraction utilisé	N° protocole	Volume total extrait (en µL)
1	RSC Blood DNA	1	490
2	RSC Blood DNA	2	540
3	RSC Blood DNA	3	590
4	RSC Blood DNA	4	300
5	RSC Blood DNA	4	500
6	RSC Blood DNA	4	700
7	RSC Blood DNA	4	900
8	RSC Blood DNA	5	300
9	RSC Blood DNA	5	500
10	RSC Blood DNA	5	700
11	RSC Blood DNA	5	900
12	RSC Blood DNA	5	1100
13	RSC Blood DNA	4	1100
14	RSC Cultured Cells DNA	1	490
15	RSC Cultured Cells DNA	2	540
16	RSC Cultured Cells DNA	3	590
17	RSC Cultured Cells DNA	4	700
18	RSC Cultured Cells DNA	4	900
19	RSC Cultured Cells DNA	5	700
20	RSC Cultured Cells DNA	5	900
21	RSC Cultured Cells DNA	6	300
22	RSC Cultured Cells DNA	6	900

Tableau 8: Paramètres des extractions réalisées avec les kits RSC Blood DNA et RSC Cultured Cells DNA.

Afin d'évaluer la qualité des différentes extractions, les éluats ont été dosés au Nanodrop® (quantificateur d'ADN) avant de réaliser les PCR *Toxoplasma*.

L'ensemble des résultats de ces essais sont récapitulés dans le Tableau 9.

N° Echantillon	Résultat de l'inoculation	N° extraction	Quantité ADN (ng/mL)	Ct VIC (inhibiteurs)	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>
84	Positive	1	231	27,89	27,86
84	Positive	2	586	27,91	26,24
84	Positive	3	993	27,76	25,20
92	Négative*	4	420	27,73	28,97
92	Négative*	5	666	28,04	28,41
92	Négative*	6	997	27,63	26,88
92	Négative*	7	1242	28,17	28,60
91	Négative	8	694	28,16	Négative
91	Négative	9	828	27,85	Négative
91	Négative	10	1204	28,11	Négative
91	Négative	11	1575	28,17	Négative
91	Négative	12	1976	28,15	Négative
92	Positive	13	1509	28,26	27,86
84	Positive	14	181	27,79	27,25
84	Positive	15	470	27,86	27,17
84	Positive	16	588	28,15	25,83
92	Négative*	17	798	28,54	29,27
92	Négative*	18	848	28,01	28,38
91	Négative	19	504	28,28	Négative
91	Négative	20	475	28,24	Négative
91	Négative	21	142	28,17	Négative
91	Négative	22	442	28,49	Négative

Tableau 9: Tableau récapitulatif des paramètres des 22 extractions d'ADN réalisées avec les kits RSC Blood DNA et RSC Cultured Cells DNA et résultats des PCR *Toxoplasma*. (* inoculation négative mais diagnostic de TC)

Les extractions sont plus performantes avec le kit RSC Blood DNA car les extractions n°1, 2 et 3 (kit RSC Blood) sont plus riches en ADN que les extractions n°14, 15 et 16 (kit RSC Cultured Cells) et les Ct de la PCR *Toxoplasma* obtenus avec le kit RSC Blood DNA sont légèrement inférieurs aux Ct obtenus suite à l'extraction avec le kit RSC Cultured Cells pour 2 des 3 échantillons testés. D'autre part il n'a pas été détecté d'inhibiteurs dans les extraits obtenus. Les

échantillons attendus négatifs sont bien négatifs, permettant d'exclure des contaminations croisées au cours de l'extraction.

D'autres essais ont été réalisés avec le kit RSC Pure Food Pathogen qui a l'avantage de ne pas utiliser de protéinase K mais uniquement deux tampons de lyse (Lysis buffer A et Lysis buffer) dont l'action est rapide (quelques minutes) encadrant une courte incubation de 4 minutes à 56°C (pas d'incubation sur la nuit). Les protocoles de préparation ont été réalisés à partir d'aliquots de l'échantillon n°94, positif à l'inoculation et sont détaillés dans le Tableau 10.

N° protocole	Volume initial placenta (µL)	Volume Lysis buffer A (µL)	Volume Lysis buffer (µL)	Volume extrait (µL)
0802 1	1000	200	600	1000
0802 2	1000	250	750	1000
0802 3	1000	600	900	1000
2702 1	500	500	300	1000
2702 2	250	250	375	875
2702 3	333	667	300	1000
2702 4	333	667	900	1000

Tableau 10: Paramètres des protocoles réalisés avec le kit RSC Pure Food Pathogen.

Les protocoles 0802 1 et 0802 2 semblent ne pas avoir été correctement extraits et ne seront donc pas testés en PCR.

Les résultats des essais effectués avec le kit Pure Food Pathogen sont résumés dans le Tableau 11.

Protocole	Quantité ADN (ng/mL)	Ct PCR Toxoplasmose	Ct VIC (inhibiteurs)
0802 3	615,4	28,12	27,38
2702 1	427,6	32,63	25,91
2702 2	130,5	28,23	26,21
2702 3	62,7	33,86	26,32
2702 4	137,7	32,89	26,89

Tableau 11: Résultats des PCR toxoplasmose et Ct inhibiteurs avec l'utilisation du kit RSC Pure Food Pathogen.

Les résultats des Ct des PCR *Toxoplasma* étaient moins satisfaisants qu'avec les résultats obtenus avec le Kit RSC Blood DNA et la lyse semblait moins efficace visuellement.

Suite à ces premiers essais, il est décidé d'utiliser le Kit RSC Blood DNA avec l'utilisation de protéinase K.

Le contenu du coffret est détaillé dans le Tableau 12.

Réactifs	Quantité
Solution de Protéinase K	2 x 1 mL
Tampon de lyse	20 mL
Cartouches Maxwell® RSC	48
Cônes CSC/RSC	50
Tubes d'élution (0,5 mL)	50
Tampon d'élution	20 mL

Tableau 12: Contenu du Kit RSC Blood Maxwell®(108).

1.2. Volume d'échantillon à extraire

Le volume maximal déposé dans la cartouche d'extraction est de +/- 1 mL. Si l'on reprend les résultats des échantillons positifs en PCR dont l'extraction a été réalisée avec le kit RSC Blood DNA, plus le volume de placenta extrait est important plus la quantité d'ADN dans l'éluat est élevée (Tableau 13). Cette quantité plus importante en ADN extrait n'est pas toujours corrélée au Ct de la PCR *Toxoplasma*, probablement en lien avec l'homogénéité modérée des échantillons.

Echantillon	Volume initial de placenta (µL)	Volume placenta extrait (µL)	Quantité d'ADN (ng/µL)	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>
84	50	50	231	27,86
84	100	100	586	26,24
84	150	150	993	25,20
92	1000	46	420	28,97
92	1000	77	666	28,41
92	1000	108	997	26,88
92	1000	138	1242	28,60
92	1000	169	1509	27,86

Tableau 13: Tableau récapitulatif des volumes de placentas extraits, de la quantité d'ADN extraite et résultats des PCR *Toxoplasma* avec le kit RSC Blood DNA.

Afin d'avoir une sensibilité correcte il est décidé d'extraire l'équivalent d'au moins 150 μ L de placenta dans les prochains essais.

1.3. Prétraitement de l'échantillon

Le coût de la protéinase K (PK) étant particulièrement élevé, il apparaît nécessaire d'en limiter sa consommation à 40 μ L par échantillon de façon à pouvoir extraire 48 échantillons (capacité du kit) avec le volume de protéinase K fourni dans le coffret. Le placenta trypsiné étant relativement compact, le pipetage s'est révélé difficile à réaliser. Nous avons donc décidé de partir d'un volume de 1 mL de placenta (correspondant à la totalité de l'aliquot congelé). A ce millilitre de placenta, 5 mL de tampon de lyse sont ajoutés avant de réaliser une incubation de 30 minutes à 56°C. Cette étape permet de fluidifier la suspension de placenta et de travailler à partir d'une fraction de cette suspension pour le traitement à la protéinase K. Plusieurs tests à partir de l'échantillon n° 94 ont été réalisés avec le kit RSC Blood DNA afin d'ajuster les quantités de réactifs. Les solutions ont ensuite été incubées toute une nuit à 56°C sous agitation avant d'être extraites. Les paramètres de ces essais sont récapitulés dans le Tableau 14.

Protocole	Volume tampon de lyse (μ L)	Volume de lysat mélangé à la PK (μ L)	Volume protéinase K (μ L)	Volume extrait (μ L)	Volume placenta extrait (μ L)
1402 1	5000	970	30	1000	162
1402 2	5000	960	40	1000	160
2102 1	5000	1200	40	1000	200
2102 2	5000	1200	40	1000	200
2102 3	5000	1200	40	1000	200

Tableau 14: Paramètres des essais d'ajustement des quantités de réactifs du kit RSC Blood DNA.

Les résultats des PCR toxoplasmose sont résumés dans le Tableau 15.

Protocole	Quantité ADN (ng/mL)	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>	Ct VIC(inhibiteurs)
1402 1	948,4	27,64	28,05
1402 2	876,2	28,90	28,26
2102 1	1020,7	27,19	28,42
2102 2	1001	27,33	28,17
2102 3	1318,1	27,45	28,49

Tableau 15: Résultats des PCR *Toxoplasma* et Ct inhibiteurs.

Les résultats sont satisfaisants quel que soit le protocole utilisé. Cependant, devant le volume parfois <1 mL restant pour être déposé dans la cartouche, il est convenu d'augmenter la quantité de la préparation qui va être mélangée à la protéinase K à 1300 µL pour les prochains essais.

Suite à ces tests, il est décidé que :

1 mL de placenta trypsiné sera mélangé à 5 mL de tampon de lyse ;

1,3 mL de cette suspension sera traité avec 40 µL de protéinase K ;

1 mL de l'échantillon traité à la protéinase K sera extrait.

1.4. Choix du tampon de lyse

Le tampon de lyse étant en quantité insuffisante dans le coffret d'extraction, un autre tampon de lyse a été essayé afin de comparer son efficacité par rapport au tampon de lyse habituellement utilisé, (tampon CLD du kit RSC Blood DNA). Il s'agit du tampon TLA (Tissue Lysis Buffer) conçu pour digérer les tissus et donc qui lyserait mieux les échantillons de placenta. Des tests ont été réalisés pour comparer les deux tampons à partir du placenta n°94. Les paramètres sont détaillés dans le Tableau 16 ainsi que les résultats des PCR.

Protocole	Volume tampon de lyse (µL)	Volume de lysat mélangé à la PK (µL)	Volume protéinase K (µL)	Volume placenta extrait (µL)	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>	Ct VIC (inhibiteurs)
1403 TLA	5000 µL de TLA	1300	40	217	Négatif	Négatif
1403 CLD	5000 µL de CLD	1300	40	217	28,51	14,93

Tableau 16: Paramètres des essais avec les tampons de lyse TLA et CLD et résultats des PCR *Toxoplasma*.

Pour l'échantillon traité avec le tampon TLA, la présence d'inhibiteurs n'a pas permis d'amplifier l'ADN de *Toxoplasma*. D'autre part, le traitement au tampon TLA ne permet pas d'homogénéiser les échantillons aussi bien qu'avec le tampon CLD, il est décidé de ne pas continuer les tests avec le tampon TLA.

Il est décidé de conserver le tampon CLD fourni avec le kit RSC Blood DNA pour préparer les échantillons à l'extraction.

1.5. Ajout de billes en verre stériles

Lors des premiers essais sur nos échantillons de placentas, il s'est posé un problème d'homogénéisation des aliquots de placenta lors de la préparation avec le tampon de lyse ; afin de s'affranchir de ce problème technique affectant très probablement le résultat de la PCR, il est décidé d'utiliser des billes en verre stériles associées au tampon de lyse lors de la préparation des échantillons pour bien homogénéiser la solution. La préparation des échantillons avec ou sans billes en verre a été comparée. Des PCR albumine sont réalisées sur les échantillons avec et sans l'utilisation de billes de verre dont les résultats sont résumés dans le Tableau 17.

N° échantillon	Ct PCR albumine sans billes	Ct PCR albumine avec billes
94	15,12	14,26
93	15,81	14,64
90	13,91	14,04
87	14,20	14,39
82	15,80	14,89
83	14,02	13,79
81	14,61	14,05
79	18,68	15,42
80	13,99	13,77
76	15,83	15,89

Tableau 17: Résultats de la PCR albumine avec ou sans homogénéisation des échantillons avec des billes de verre.

Pour la majorité des échantillons le Ct de la PCR albumine est plus faible avec l'utilisation de billes ce qui prouve la meilleure extraction de l'ADN. Les PCR toxoplasmose ont été réalisées dans un second temps et les résultats sont concordants avec les résultats attendus.

Il est donc décidé d'utiliser des billes en verre stériles pour homogénéiser les échantillons dans le tampon de lyse.

1.6. Protocole définitif

Après ces mises au point, un protocole définitif a été mis en place.

Matériel nécessaire :

- vortex
- bain marie à 56°C
- portoirs
- pipettes de 10-100 µL et 100-1000 µL
- cônes pour pipettes, stériles avec filtre
- tubes Falcon® stériles de 15 mL
- tubes sérothèque stériles
- billes en verre stériles (ø 3mm)
- oèses stériles
- passe-têtes stériles
- Parafilm®

A partir des aliquots de placenta congelés(Figure 41) :

- Décongeler l'aliquot de placenta au bain-marie pendant quelques minutes (le temps que le bain-marie atteigne 56°C).
- Sous un PSM et à l'aide d'une oèse stérile si besoin, déposer l'échantillon de 1 mL de placenta dans un tube Falcon et y ajouter 5mL de tampon de lyse et des billes en verre stériles.
- Bien homogénéiser le contenu du tube Falcon® à l'aide d'un vortex et le déposer dans le bain marie à 56°C pendant 30 minutes sous agitation (160 rpm).
- Prélever 1300 µL de la préparation précédente et les déposer dans un autre tube Falcon® dans lequel on rajoute 40 µL de protéinase K.
- Recouvrir le tube Falcon® de parafilm afin d'éviter toute évaporation lors de l'incubation.
- Déposer le tube Falcon® sur un portoir dans le bain marie à 56°C sous agitation (160 rpm) pendant toute une nuit.
- Le lendemain matin, sortir le tube Falcon® du bain marie et transférer la totalité du lysat à l'aide d'une passe tête stérile dans un tube sérothèque identifié.

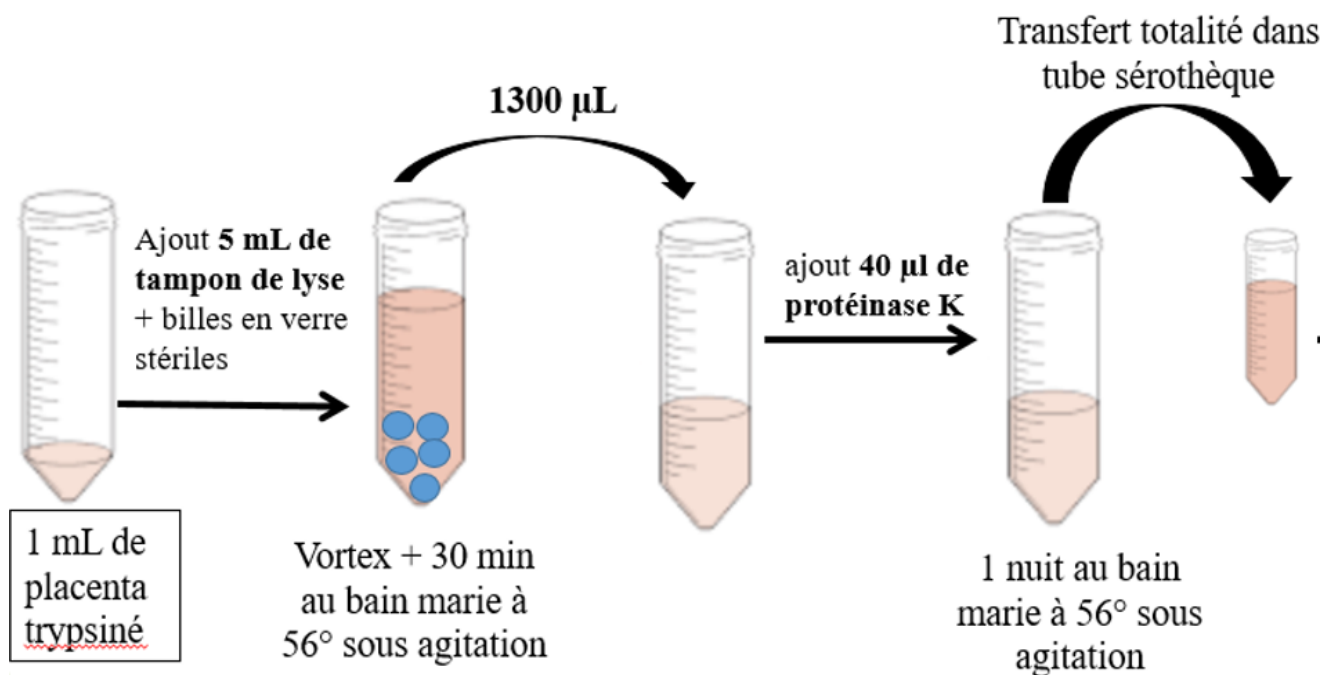


Figure 41: Protocole définitif de pré-traitement des échantillons.

L'extraction de l'échantillon par l'extracteur Maxwell peut être réalisée :

- Retirer le rack de l'extracteur
- Placer une cartouche du Kit RSC Blood DNA sur le rack et retirer le film aluminium.
- Transférer 1 mL du lysat dans le puit n°1 de la cartouche.
- Placer un tube d'élution identifié et débouché sur l'emplacement prévu.
- Ajouter 200 µL de tampon d'élution dans le tube d'élution.
- Placer un « plongeur » dans le puit n°8 de la cartouche.
- Déposer le rack dans l'extracteur en le clipsant.
- Lancer le protocole d'extraction RSC Blood DNA (37 minutes d'extraction).
- A la fin du protocole, sortir le rack et boucher le tube d'élution avant de le récupérer.
- Jeter la cartouche.
- Remettre le rack sur son emplacement dans l'extracteur et lancer un protocole de purification aux UV (destruction de l'ADN).
- Congeler le tube d'élution en attendant l'amplification par PCR.

2. Application de la technique aux échantillons de placenta

Quatre-vingt-treize échantillons de placentas trypsinés ont été traités selon ce protocole définitif dont 48 étaient positifs à l'inoculation, 43 étaient négatifs et 2 étaient négatifs à l'inoculation mais avec un diagnostic de toxoplasmose congénitale posé ultérieurement. Les résultats des échantillons extraits puis passés en PCR sont présentés dans le Tableau 18.

N° échantillon	Date échantillon	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>	Ct VIC (inhibiteurs)	Ct PCR albumine
1	18/04/2008	POSITIF	28,12 / 28,22	28,28/ 28,91	17,26
2	29/04/2008	NEGATIF	NEG/ NEG	28,42/ 28,38	16,9
3	26/11/2008	NEGATIF	NEG/ NEG	28,42/ 28,35	16,58
4	11/12/2008	POSITIF	33,98/ NEG	28,49/ 28,60	16,5
5	15/12/2008	NEGATIF	NEG/ NEG	28,46/ 28,89	17,14
6	18/12/2008	POSITIF	24,45 / 25,23	28,42/ 28,43	16,75
7	09/02/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,86/29,08	17,07
8	11/02/2009	POSITIF	NEG/33,52	29,29/28,79	18,64
9	06/03/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	29,07/28,73	17,70
10	04/09/2009	POSITIF	31,06/36,15	28,92/29,10	17,43
11	17/03/2009	POSITIF	34,60/36,01	28,82/28,87	17,74
12	18/03/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,65/28,62	16,91
13	22/03/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,86/29,00	16,64
14	25/03/2009	POSITIF	27,23/28,10	29,09/ 28,85	17,12
15	15/04/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,95/28,91	18,58
16	18/04/2009	POSITIF	NEG/ NEG	28,91/29,25	16,27
17	16/06/2009	POSITIF	26,31 / 26,32	28,57/ 28,50	16,28
18	16/06/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,59/ 28,52	15,87
19	20/08/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,69/27,46	16,51
20	24/08/2009	POSITIF	26,63/25,88	29,50/29,27	14,91
21	25/08/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	29,38/29,57	16,57
22	27/08/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	29,35/29,38	17,83
23	28/08/2009	POSITIF	NEG/33,39	29,41/29,26	15,73
24	04/09/2009	POSITIF	34,17/34,72	29,49/29,33	16,86
25	10/09/2009	POSITIF	NEG/ NEG	29,01/ 29,24	16,62

N° échantillon	Date échantillon	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>	Ct VIC (inhibiteurs)	Ct PCR albumine
26	12/09/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	29,18/29,49	18,25
27	14/09/2009	POSITIF	25,35/26,14	29,21/29,09	15,48
28	21/09/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,93/29,59	15,37
29	22/09/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	29,24/29,56	15,48
30	22/09/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	29,53/28,35	16,43
31	29/09/2009	POSITIF	26,86/28,69	28,90/28,68	15,85
32	11/11/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,53/28,54	14,78
33	14/11/2009	POSITIF	25,06/25,06	28,58/28,50	15,72
34	06/12/2009	NEGATIF	NEG/ NEG	28,99/28,96	15,74
35	13/12/2009	POSITIF	25,50/25,84	28,41/28,83	16,22
36	04/02/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,69/28,57	17,19
37	07/02/2010	POSITIF	28,28/31,81	28,73/28,48	15,96
38	27/02/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,69/28,55	16,20
39	01/03/2010	POSITIF	24,60/24,11	29,18/28,52	15,77
40	17/03/2010	POSITIF	26,66/26,62	28,97/28,52	17,38
41	17/03/2010	POSITIF	NEG/34,60	28,86/28,82	16,96
42	18/03/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,86/28,66	16,80
43	11/05/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,57/29,04	15,21
44	05/06/2010	POSITIF	20,79/20,66	28,15/28,62	15,61
45	25/06/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,69/29,03	15,97
46	28/06/2010	POSITIF	30,73/29,36	29,15/28,65	16,35
47	04/07/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,92/28,44	16,85
48	07/07/2010	POSITIF	27,63/27,84	28,64/28,74	15,62
49	18/07/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,72/28,78	15,55
50	21/07/2010	POSITIF	33,55/31,56	28,58/28,64	16,10
51	02/08/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,46/28,45	16,02
52	06/08/2010	POSITIF	26,46/26,64	28,87/29,08	17,86
53	20/08/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,64/28,69	17,11
54	25/08/2010	POSITIF	28,56/28,54	29,13/28,91	15,67
55	24/10/2010	POSITIF	33,65/NEG	28,39/28,98	15,17
56	31/10/2010	NEGATIF	NEG/ NEG	28,61/28,55	15,42

N° échantillon	Date échantillon	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>	Ct VIC (inhibiteurs)	Ct PCR albumine
57	01/11/2010	POSITIF	28,38/30,06	28,94/28,86	15,48
58	15/11/2010	POSITIF	24,49/24,71	28,33/28,44	15,01
59	08/02/2011	POSITIF	26,82/25,47	28,66/28,70	15,69
60	10/02/2011	NEGATIF	33,82/NEG	28,72/28,61	15,23
61	11/06/2011	NEGATIF	NEG/ NEG	28,56/29,01	15,99
62	18/06/2011	POSITIF	29,56/28,72	28,77/28,81	14,91
63	23/06/2011	NEGATIF	NEG/ NEG	28,96/28,88	17,01
64	02/07/2011	POSITIF	23,89/24,03	28,47/28,50	15,98
65	09/07/2011	NEGATIF	NEG/ NEG	28,45/28,42	15,68
66	06/08/2011	POSITIF	NEG/NEG	28,50/28,85	14,86
67	24/09/2011	NEGATIF	NEG/NEG	28,75/28,54	15,38
68	01/10/2011	POSITIF	35,95/NEG	28,68/28,87	15,14
69	18/06/2012	POSITIF	22,34/22,88	28,27/28,21	15,89
70	09/06/2015	NEGATIF	NEG/ NEG	28,34/ 28,49	13,89
71	11/06/2015	POSITIF	29,57 / 29,40	28,63/28,50	14,15
72	01/07/2015	NEGATIF	NEG/ NEG	24,15/ 24,08	15,13
73	03/07/2015	POSITIF	24,94 / 24,56	24,35/ 24,73	12,71
74	15/08/2015	NEGATIF	NEG/ NEG	24,18/ 24,08	12,81
75	18/08/2015	POSITIF	28,9 / 30,3	23,76/ 22,99	14,84
76	05/11/2015	NEGATIF	NEG/ NEG	27,89/ 28,04	13,89
77	19/11/2015	POSITIF	27,79 / 27,10	23,11/ 22,69	15,14
78	27/12/2015	NEGATIF	NEG / NEG	23,94/ 23,81	14,08
79	13/01/2016	NEGATIF	NEG/ NEG	28,15/ 27,84	15,42
80	13/01/2016	POSITIF	25,91/ 25,62	28,48/ 28,32	13,77
81	15/01/2016	NEGATIF	NEG/ NEG	28,00/ 28,12	14,05
82	02/02/2016	POSITIF	29,19 / 32,16	28,31 / 27,9	14,89
83	03/02/2016	POSITIF	27,67 / 26,61	28,74/ 28,42	13,79
85	28/04/2016	NEGATIF	NEG/ NEG	28,50/ 28,66	15,2
86	28/04/2016	POSITIF	NEG/ NEG	23,72/ 23,40	15,44
87	01/08/2016	NEGATIF	NEG/ NEG	28,11/28,24	14,39
88	14/08/2016	POSITIF	27,71/ 28,32	20,88/ 22,51	17,89

N° échantillon	Date échantillon	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>	Ct VIC (inhibiteurs)	Ct PCR albumine
89	20/03/2017	NEGATIF	NEG / NEG	23,85/24,32	14,02
90	24/03/2017	POSITIF	32,36 / 30,07	28,22/ 28,02	14,04
91	11/07/2017	NEGATIF	NEG / NEG	27,77/ 27,66	18,38
92	04/08/2017	NEGATIF	27,91/ 27,67	27,72/ 27,80	16,83
93	19/08/2017	NEGATIF	NEG/ NEG	28,08/ 28,05	14,64
94	22/08/2017	POSITIF	27,60 / 27,71	28,08/ 27,91	14,26

Tableau 18: Résultats des PCR Albumine et *Toxoplasma* des 93 échantillons de placentas et comparaison avec le résultat de l'inoculation. En rouge : échantillons discordants entre le résultat de l'inoculation et la PCR *Toxoplasma*.

Les échantillons discordants entre inoculation et PCR ont été repassés en PCR *Toxoplasma* (Tableau 19).

N° échantillon	Date échantillon	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i> 1 ^{er} passage	Ct PCR <i>Toxoplasma</i> 2 ^{ème} passage
16	18/04/2009	POSITIF	NEG/NEG	34,50/NEG
25	10/09/2009	POSITIF	NEG/NEG	NEG/NEG
60	10/02/2011	NEGATIF	33,82/NEG	NEG/36,29
66	06/08/2011	POSITIF	NEG/NEG	NEG/35,44
86	28/04/2016	POSITIF	NEG/NEG	NEG/NEG

Tableau 19: Résultats des PCR *Toxoplasma* des 5 échantillons de placentas discordants entre l'inoculation à la souris et la PCR *Toxoplasma*.

En rouge : échantillons toujours discordants avec le résultat de l'inoculation lors du 2^{ème} passage en PCR *Toxoplasma*.

Parmi les 48 échantillons positifs à l'inoculation, 46 sont positifs en PCR *Toxoplasma* mais 2 sont négatifs ; parmi les 45 échantillons négatifs à l'inoculation, 43 n'ont pas de diagnostic de TC ou un statut inconnu mais 2 ont un diagnostic de TC parmi lesquels un est positif en PCR *Toxoplasma* et l'autre est négatif (figure 42 et tableau 20).

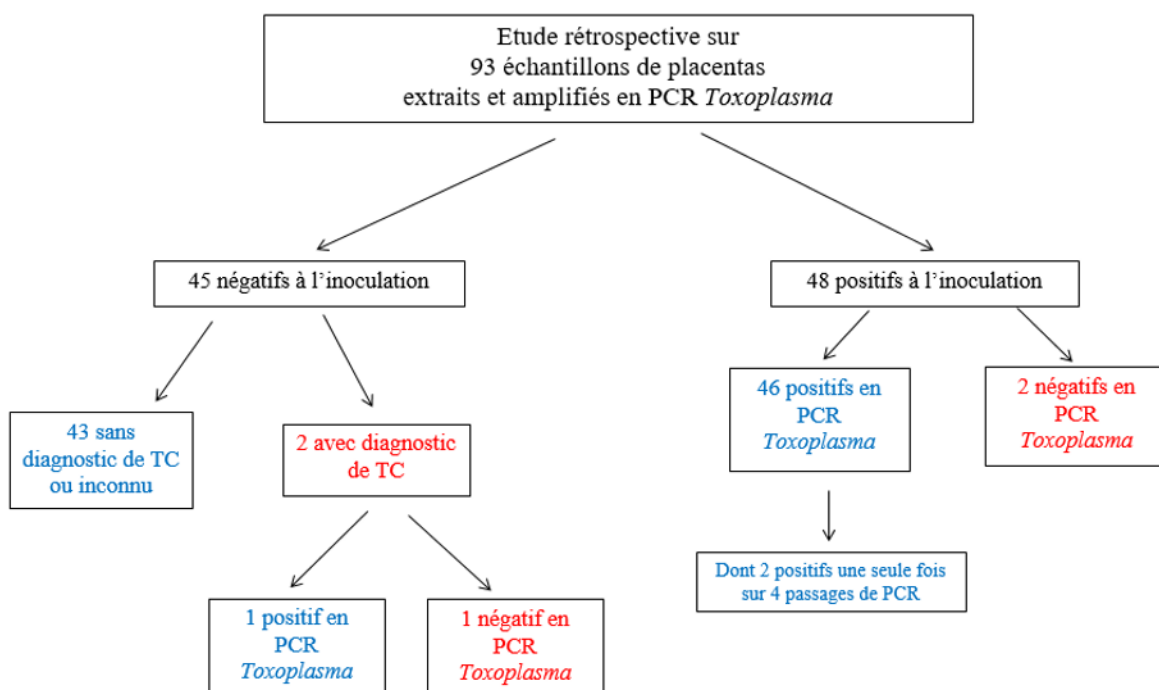


Figure 42: Résultats de la PCR *Toxoplasma* des 93 échantillons de placentas.

	PCR +	PCR -	Total
Inoculation +	46	2	48
Inoculation -	2*	43	45
Total	48	45	93

Tableau 20: Tableau récapitulatif des résultats de l'inoculation et de la PCR *Toxoplasma* des 93 échantillons de placentas étudiés.

*inclus un cas de toxoplasmose congénitale diagnostiquée en période néonatale associée à une inoculation à la souris négative.

La concordance entre la PCR *Toxoplasma* et l'inoculation à la souris est donc de plus de 95% (89 échantillons concordants et 4 discordants donc $89/93=0,957$).

III. DISCUSSION

L'objectif du travail de cette thèse était de mettre au point une technique de biologie moléculaire pour détecter l'ADN de *T. gondii* à partir de placentas pour aider au diagnostic de toxoplasmose congénitale et de comparer les résultats obtenus à ceux de l'inoculation à la souris, technique actuellement utilisée en routine.

1. Choix des techniques

Nous avons choisi de mettre en place une technique d'extraction automatisée plutôt qu'une technique manuelle. En effet, les techniques automatisées permettent d'éviter les erreurs de manipulation et de réduire le temps technique. Cependant, l'extraction avec l'automate Maxwell® impose un pré-traitement manuel des échantillons. De plus, lors de la mise au point du protocole, nous nous sommes fixés les deux contraintes suivantes : 1) extraire au minimum l'équivalent de 150 µL de placenta pour avoir une sensibilité suffisante et 2) utiliser uniquement le volume de protéinase K fournie dans le coffret pour ne pas augmenter le coût de l'extraction.

Le kit de PCR *Toxoplasma* utilisé correspond à celui utilisé en routine, pour lequel les performances ont déjà été évaluées (109).

2. Performances de la technique

La positivité de la détection du contrôle interne dans tous les échantillons nous permet de conclure à l'absence d'inhibiteurs dans les éluats obtenus, inhibiteurs qui auraient empêché l'amplification de l'ADN de *T. gondii*.

La concordance technique entre les résultats obtenus avec la technique de biologie moléculaire et la technique d'inoculation à la souris est de plus de 95% (89 échantillons concordants et 4 discordants donc $89/93=0,957$).

3. Interprétation des discordances entre les deux techniques

Les résultats de la technique de PCR ont une très bonne concordance avec les résultats de l'inoculation (> 95%), malgré quelques cas de discordance, qui sont discutés ici.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les discordances entre inoculation et PCR pour certains échantillons.

Concernant l'échantillon n° 86 (datant de 2016), positif en inoculation mais négatif en PCR : il s'agit d'une probable inversion entre deux échantillons au moment de la préparation de l'extraction ; cette hypothèse est confirmée par le fait que lors d'un précédent travail au laboratoire

du CHU de Nantes cet échantillon était positif en PCR *Toxoplasma* (107). Il n'a pas été possible de réaliser une nouvelle extraction en raison de l'indisponibilité de l'échantillon.

Concernant l'échantillon n° 25 (datant de 2009, toxoplasmose congénitale confirmée), positif en inoculation mais négatif en PCR : on peut poser l'hypothèse qu'une congélation trop longue peut détruire l'ADN du parasite, surtout s'il était présent en faible quantité initialement dans l'échantillon.

L'échantillon n° 60 (datant de 2011 ; toxoplasmose congénitale exclue), négatif à l'inoculation mais positif en PCR : il peut s'agir de la présence en faible quantité d'ADN de *T. gondii* non détectée en inoculation. D'autre part, bien que les placentas soient broyés et lysés (par la trypsine et mécaniquement), l'échantillon obtenu n'est pas homogène ; on peut donc supposer que l'aliquot utilisé pour l'inoculation à la souris ne contenait pas de toxoplasmes alors que l'aliquot utilisé pour la technique de biologie moléculaire contenait des toxoplasmes. Enfin, la technique d'inoculation à la souris permet de détecter uniquement les toxoplasmes qui sont viables, alors que les techniques de biologie moléculaire amplifie l'ADN quelle que soit la viabilité du pathogène.

L'échantillon n°92(datant de 2017), négatif à l'inoculation mais positif en PCR : il s'agit d'une toxoplasmose congénitale. Ce résultat laisse suggérer une plus grande sensibilité de la technique de biologie moléculaire.

Devant ces quelques discordances, une étude prospective s'avère nécessaire pour confirmer les performances de la technique.

4. Avantages et inconvénients de mise en place de la PCR *Toxoplasma* sur placenta versus inoculation à la souris

D'un point de vue délai de rendu du résultat, la technique de biologie moléculaire a l'avantage d'apporter un résultat dans un délai beaucoup plus bref, en une semaine maximum contre 4 semaines (minimum) actuellement avec la technique d'inoculation à la souris.

D'un point de vue interprétation des résultats, des résultats faussement positifs sont parfois suspectés par la technique d'inoculation (résultat de l'inoculation en désaccord avec la globalité des résultats du dossier). Dans ce cas, une nouvelle sérologie chez la souris est répétée 1 à 2 semaines plus tard, ce qui allonge le délai de rendu du résultat. Si la deuxième sérologie reste positive, une PCR *Toxoplasma* est réalisée sur le cerveau de la souris afin de confirmer ou non l'absence de toxoplasmes et donc la négativité du placenta. Dans ce contexte précis, il est suspecté une détection des anticorps maternels présents dans l'échantillon car ce problème est observé lorsque les taux maternels en IgG sont très élevés. La technique de biologie moléculaire est non affectée par cette situation. Concernant l'impossibilité d'obtenir un résultat par la technique de l'inoculation, il arrive

qu'une pullulation microbienne dans le placenta entraîne une infection chez les souris et leur décès prématuré ; ce problème se rencontre surtout lorsque le délai d'acheminement du placenta est trop long. Ce problème ne sera pas observé par la technique de biologie moléculaire.

Ethiquement parlant, cette technique de PCR ne demande aucune utilisation d'animaux, ce qui est intéressant à l'heure où les normes sont de plus en plus drastiques concernant l'expérimentation animale à des fins scientifiques et médicales notamment avec la règle des 3 R : Réduction du nombre d'animaux utilisés en expérimentation, Raffiner la méthode afin de diminuer le mal-être animal et Remplacer autant que possible les modèles animaux (110). Ces règles éthiques ont été adoptées et introduites dans la réglementation européenne et française par le Conseil de l'Europe, l'Union européenne et la France via les décrets n° 2001-464 et 2001-486(111,112).

Il serait donc très intéressant de mettre en place cette technique de biologie moléculaire en routine pour la détection de *T. gondii* sur placenta au sein du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes.

Cependant deux points restent à explorer. En cas de détection d'inhibiteurs de PCR, aucun résultat ne pourra être rendu. Bien que cette situation n'ait pas été rencontrée, il sera intéressant de déterminer la fréquence de ce problème sur un travail prospectif. D'autre part, la technique de détection de l'ADN de *T. gondii* est probablement plus sensible que l'inoculation à la souris, il sera important d'évaluer une éventuelle augmentation du nombre de placentas détectés positifs sans diagnostic de toxoplasmose congénitale.

5. Future stratégie d'analyse du placenta au laboratoire

Les résultats obtenus sur cette étude rétrospective confirment l'intérêt d'utiliser cette technique en première ligne au laboratoire. D'ailleurs, la technique de PCR *Toxoplasma* sur placenta est déjà largement utilisée dans d'autres centres en France : sur les 37 centres qui participent au CNR toxoplasmose, 18 laboratoires utilisent la PCR et 9 l'inoculation à la souris (dont 2 uniquement si la PCR est positive). Le CHU de Nantes est actuellement le seul centre à utiliser uniquement l'inoculation à la souris pour l'analyse des placentas.

La question d'arrêter totalement l'inoculation à la souris se pose désormais. Plusieurs études anciennes montrent l'intérêt d'associer la technique de PCR à l'inoculation afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse du placenta. Cependant, un rapport récent de l'HAS place l'inoculation à la souris comme une technique « inutile à des fins diagnostiques » (43). D'un point de vue épidémiologique, la conservation de la technique d'inoculation a un intérêt non négligeable car elle permet d'isoler les souches de *T. gondii* qui sont ensuite envoyées au CNR pour études épidémiologiques.

Le nombre de réplicats à réaliser en PCR est également un paramètre à définir. En effet, afin de détecter les très faibles charges parasitaires, comme dans les échantillons n° 16 et n° 66 qui sont positives pour un seul réplicats sur les 4 déposés, il faudrait réaliser 4 réplicats par placenta. Cependant, sachant que la positivité du placenta n'est pas un critère suffisant pour poser un diagnostic de toxoplasmose congénitale, que cette faible sensibilité pourrait s'expliquer par le fait qu'il s'agit d'une étude rétrospective affectant probablement la qualité de l'ADN et que l'augmentation du nombre de PCR augmente le coût technique (environ 10 euros par point de PCR *Toxoplasma*), cette stratégie d'augmenter le nombre de réplicats ne sera probablement pas retenue. Enfin pour abandonner la technique d'inoculation, une étude comparative prospective est nécessaire ; les deux techniques seraient réalisées en parallèle pour chaque placenta et permettrait de vérifier les données de performances obtenues entre les deux techniques afin s'assurer que la PCR est au moins aussi sensible que la technique d'inoculation.

6. Apport clinique de la technique de PCR

Sur le plan clinique, la mise en place d'une PCR *Toxoplasma* à partir de placentas pourrait être intéressante pour la prise en charge plus précoce du nouveau-né ; en effet, en cas de diagnostics prénatal et néonatal sérologiques négatifs, la positivité du placenta, bien qu'insuffisante pour poser un diagnostic de toxoplasmose congénitale, est souvent un argument biologique suffisant pour instaurer un traitement surtout si la séroconversion a eu lieu en fin de grossesse (risque de transmission materno-fœtal plus important).

IV. CONCLUSION

Dans le but de rendre les techniques d'analyses biologiques de plus en plus performantes (sensibilité, spécificité) et avec l'avènement de la biologie moléculaire, les techniques de PCR en temps réel se développent largement dans les laboratoires de routine. De plus, la technique d'inoculation à la souris étant devenue une technique obsolète qui n'a plus sa place dans le diagnostic, il est intéressant de mettre en place une technique de biologie moléculaire pour la détection de *T. gondii* à partir des placentas.

C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a permis de montrer la faisabilité de la mise en place d'une technique de biologie moléculaire par PCR en temps réel à partir de placentas dans l'aide au diagnostic de la toxoplasmose congénitale. Malgré les quelques discordances avec la technique actuelle d'inoculation à la souris, cette technique présenterait de nombreux avantages : rendu de résultats beaucoup plus rapide, impact clinique intéressant et intérêt éthique.

Ces résultats statistiques sont obtenus à partir d'une cohorte rétrospective de placentas relativement faible, il est donc nécessaire de l'élargir à un recueil de données au cours d'une étude prospective au sein du laboratoire afin que cette technique remplace à terme la méthode d'inoculation à des souris. Il serait aussi intéressant d'étendre cette étude à l'analyse des sangs de cordon pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Davenel S, Galaine J, Guelet B, Marteil S, Robert-Gangneux F. La toxoplasmose congénitale en France en 2009. 2010;29:26.
2. Rapport-Act-CNR-Toxoplasmose-2016-DEF.pdf [Internet]. [cité 5 sept 2018]. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2018/03/Rapport-Act-CNR-Toxoplasmose-2016-DEF.pdf>
3. Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. Traffic Cph Den. sept 2003;4(9):581-6 .
4. Dubie T, Terefe G, Asaye M, Sisay T. Taxonomic classification of *Toxoplasma gondii* Kingdom Protista Sub kingdom Protozoa Phylum Apicomplexa Class Conoidasida Order Eucoccidiorida Sub order Eimeriorina Family Sarcocystidae Sub family Toxoplasmatinae Genus *Toxoplasma* Species *Toxoplasma gondii* [Internet]. 2014 [cité 6 août 2018]. Disponible sur: [/paper/Taxonomic-classification-of-Toxoplasma-gondii-Sub-Dubie-Terefe/f51fc547408bb7ce652de76134d0714306b94411](#)
5. ANOFEL. TOXOPLASMOSE. In: Toxoplasmose - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie [Internet]. 2016 [cité 19 déc 2017]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/toxoplasmose/site/html/1.html>
6. Fortier B. Toxoplasme et toxoplasmoses [Internet]. EM-Consulte. 2000 [cité 3 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/3959/toxoplasme-et-toxoplasmoses>
7. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev Mol Med. 6 janv 2001;2001:1-19.
8. Pettersen EK. Destruction of *Toxoplasma gondii* by HC1 solution. Acta Pathol Microbiol Scand [B]. août 1979;87(4):217-20.
9. Dubey JP. Toxoplasmosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract. nov 1987;17(6):1389-404.
10. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. avr 2012;25(2):264-96.
11. Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. Am J Vet Res. juin 1988;49(6):910-3
12. Ferguson DJ, Birch-Andersen A, Siim JC, Hutchison WM. Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol Microbiol Scand [B]. juin 1978;86B(3):165-7.
13. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clin Microbiol Rev. 4 janv 1998;11(2):267-99.
14. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med. 1 oct 1970;132(4):636-62.

15. Center for Disease Control and Prevention. CDC -Toxoplasmosis [Internet]. 2017 [cité 5 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>
16. Aspinall TV, Guy EC, Roberts KE, Joynton DHM, Hyde JE, Sims PFG. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int J Parasitol.* janv 2003;33(1):97-103.
17. Dao A, Fortier B, Soete M, Plenat F, Dubremetz JF. Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. *Int J Parasitol.* janv 2001;31(1):63-5
18. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* déc 1995;172(6):1561-6
19. 1_Rap-Act-année-dexercice-2014-CNR-TOXOPLASMOSE-090415-DEF.pdf [Internet]. [cité 5 sept 2018]. Disponible sur: http://cnrttoxoplasnose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2015/10/1_Rap-Act-ann%C3%A9e-dexercice-2014-CNR-TOXOPLASMOSE-090415-DEF.pdf
20. Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis.* 15 avr 2009;199(8):1155-67
21. Belluco S, Simonato G, Mancin M, Pietrobelli M, Ricci A. *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 11 oct 2017;1-12.
22. Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Hasseine L, Dardé M-L, et al. Toxoplasmosis and Horse Meat, France. *Emerg Infect Dis.* juill 2011;17(7):1327-8
23. Giordano LFC, Lasmar EP, Tavora ERF, Lasmar MF. Toxoplasmosis transmitted via kidney allograft: case report and review. *Transplant Proc.* mars 2002;34(2):498-9
24. Fernández F, Ouviña G, Clot E, Fernandes Guido R, Codoni C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in the western part of Great Buenos Aires, Argentina, 1993. *Vet Parasitol.* août 1995;59(1):75-9
25. Robert-Gangneux F, Murat J-B, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Gangneux J-P, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* déc 2011;27(12):530-6
26. Nelson JC, Kauffmann DJ, Ciavarella D, Senisi WJ. Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. *Ann Ophthalmol.* juill 1989;21(7):253-4
27. Skinner LJ, Timperley AC, Wightman D, Chatterton JM, Ho-Yen DO. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand J Infect Dis.* 1990;22(3):359-61.
28. Desmonts G, Couvreur J, Ben Rachid MS. [Toxoplasmosis, the mother and the child]. *Arch Fr Pédiatr.* déc 1965;22(10):1183-200.

29. Papoz L, Simondon F, Saurin W, Sarmini H. A simple model relevant to toxoplasmosis applied to epidemiologic results in France. *Am J Epidemiol.* janv 1986;123(1):154-61.
30. Ancelle T, Goulet V. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. *BEH* n°51 [Internet]. 1996 [cité 19 déc 2017]. Disponible sur: <http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/1996/9651/index.html>
31. Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos J-C. Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev Epidemiol Sante Publique.* août 2009;57(4):241-8
32. Tourdjman M. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : évolution de la séroprévalence et des facteurs associés entre 1995 et 2010, à partir des Enquêtes nationales périnatales. In 2015 [cité 16 janv 2018]. Disponible sur: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2015/15-16/2015_15-16_5.html
33. Pelloux H, Fricker-Hidalgo H, Pons JC, Bost-Bru C, Brenier-Pinchart MP, Jouk PS, et al. [Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr.* févr 2002;9(2):206-12.
34. Aubry P. Toxoplasmose. Diplôme de médecine tropicale des pays de l'océan indien; 2013 déc 20.
35. Bousquet A, Bigaillon C, Dumitrescu N, Larréché S, Godreuil C, Mestiri R, et al. Acute myocarditis in an immunocompetent young man: Don't forget *Toxoplasma gondii*. *Int J Cardiol.* juill 2016;214:358-9
36. Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* avr 2009;15(4):656-8
37. Raffi F, Tiab M, Morin O, Derouin F. [Cerebral toxoplasmosis concomitant with primary toxoplasma infection in AIDS]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 28 mars 1992;21(12):584-5
38. Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, et al. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. The BIOTOXO Study Group. *AIDS Lond Engl.* févr 1997;11(2):177-84.
39. Toxoplasmose pulmonaire [Internet]. [cité 6 août 2018]. Disponible sur: <http://www.respir.com/doc/abonne/base/ParasitoseToxoplasmose.asp>
40. Bessières M-H, Cassaing S, Fillaux J, Berrebi A. Toxoplasmose et grossesse. *Rev Francoph Lab.* 1 mai 2008;2008(402):39-50.
41. Flori P, Chene G, Varlet M-N, Sung RTM. *Toxoplasma gondii* serology in pregnant woman: characteristics and pitfalls. *Ann Biol Clin (Paris).* avr 2009;67(2):125-33.
42. Murat J-B, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther.* sept 2013;11(9):943-56.
43. HAS février 2017. Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et

postnatal) et la toxoplasmose oculaire [Internet]. [cité 19 déc 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2653655/fr/diagnostic-biologique-de-la-toxoplasmose-acquise-du-sujet-immunocompetent-dont-la-femme-enceinte-la-toxoplasmose-congenitale-diagnostic-pre-et-postnatal-et-la-toxoplasmose-oculaire

44. Indirect ELISA [Internet]. [cité 14 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.sinobiological.com/indirect-elisa.html>
45. Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis.* nov 2012;44(11):805-14.
46. Seguela JP, Bessieres MH, Linas MD, Recco P, Regnard J, Jaubert M, et al. Toxoplasmose : Serodiagnostic par immunoenzymologie (E.L.I.S.A.). *Médecine Mal Infect.* 1 août 1982;12(8):459-65.
47. Armengol C, Cassaing S, Roques-Malecaze C, Chauvin P, Iriart X, Berry A, et al. Time before anti-Toxoplasma IgG seroconversion detection by 7 commercial assays in French pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis.* févr 2017;87(2):103-7.
48. Maudry A, Chene G, Chatelain R, Patural H, Belleste B, Tisseur B, et al. Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot. *Clin Vaccine Immunol.* sept 2009;16(9):1322-6
49. Begeman JJ, Lykins J, Zhou Y, Lai BS, Levigne P, El Bissati K, et al. Point-of-care testing for Toxoplasma gondii IgG/IgM using Toxoplasma ICT IgG-IgM test with sera from the United States and implications for developing countries. *Sinnis P, éditeur. PLoS Negl Trop Dis.* 26 juin 2017;11(6):e0005670.
50. Desmonts G, Naot Y, Remington JS. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired Toxoplasma infections. *J Clin Microbiol.* nov 1981;14(5):486-91.
51. Immunosorbent Agglutination Assay ISAGA [Internet]. [cité 8 juin 2018]. Disponible sur: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Immunosorbent_Agglutination_Assay_ISAGA.png
52. Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. Duration of the IgM response in women acquiring Toxoplasma gondii during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol Infect.* juin 2004;132(3):541-8
53. Kaparos N, Favrat B, D'Acremont V. [Fever and lymphadenopathy: acute toxoplasmosis in an immunocompetent patient]. *Rev Med Suisse.* 26 nov 2014;10(452):2264, 2266-8, 2270.
54. wb_toxo2_vs09_fr_en.pdf [Internet]. [cité 10 sept 2018]. Disponible sur: http://www.ldbiodiagnostics.com/fichiers_site/a1181ldb/contenu_pages/wb_toxo2_vs09_fr_en.pdf
55. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* juill 2012;10(7):815-28.
56. Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. *Clin Experiment Ophthalmol.* févr 2013;41(1):95-108.

57. Berger F. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : évolution de la séroprévalence et de l'incidence et facteurs associés, 1995-2003. :5.
58. Nogareda F, Le Strat Y, Villena I, De Valk H, Goulet V. Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation. *Epidemiol Infect.* août 2014;142(8):1661-70.
59. RAPPORT HAS 2009 Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse [Internet]. [cité 10 sept 2018]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-12/depistages_prenatals_obligatoires__synthese_vf.pdf
60. Villard O. Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage.
61. Décret n°92-143 du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et postnatal. 92-143 févr 14, 1992.
62. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* janv 2016;84(1):22-33.
63. Fricker-Hidalgo H, Cimon B, Chemla C, Darde ML, Delhaes L, L'ollivier C, et al. *Toxoplasma* seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol.* juill 2013;51(7):2103-11.
64. CNR Toxoplasmose « Surveillance de la Toxoplasmose » [Internet]. Disponible sur: http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=246
65. Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brezin AP, Thulliez P, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 24 juin 2010;15(25).
66. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet Lond Engl.* 29 mai 1999;353(9167):1829-33.
67. Couvreur J. [Problems of congenital toxoplasmosis. Evolution over four decades]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 10 avr 1999;28(14):753-7
68. Ancelle T, Carme B, Réseau National de Santé Publique. (R.N.S.P.). Saint-Maurice. FRA. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. Résultats d'une enquête nationale périnatale. Saint-Maurice: RNSP; 1996 oct p. 34p.
69. Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, Metzner S, James ER, Torun N, et al. *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 1 nov 2013;208(9):1520-8

70. Brézin AP, Thulliez P, Couvreur J, Nobré R, Mcleod R, Mets MB. Ophthalmic outcomes after prenatal and postnatal treatment of congenital toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* juin 2003;135(6):779-84.
71. Hanquinet S, Merlini L, Fluss J. Imagerie de la pathologie infectieuse cérébrale chez l'enfant. 2013;16:14.
72. HAS 2009. Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse et dépistage prénatal de l'hépatite B – Pertinence des modalités de réalisation [Internet]. [cité 25 oct 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_893585/fr/surveillance-serologique-et-prevention-de-la-toxoplasmose-et-de-la-rubeole-au-cours-de-la-grossesse-et-depistage-prenatal-de-l-hepatite-b-pertinence-des-modalites-de-realisation
73. Recommandations-Diagnostic-TC-biomol-janvier-2012.pdf [Internet]. [cité 28 juin 2018]. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2012/06/Recommandations-Diagnostic-TC-biomol-janvier-2012.pdf>
74. Seeds JW. Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe? *Am J Obstet Gynecol.* août 2004;191(2):607-15.
75. Filisetti D, Brenier-Pinchart M-P, Sterkers Y. Logigramme associé aux «Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale ». :2.
76. Filisetti D. Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale [Internet]. cnrttoxoplasmose. 2012 [cité 19 déc 2017]. Disponible sur: <http://docplayer.fr/24541842-Recommandations-destinees-aux-professionnels-de-sante-concernant-le-diagnostic-par-biologie-moleculaire-de-la-toxoplasmose-congenitale.html>
77. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* avr 2002;96 Suppl 1:S205-215.
78. HAS février 2017. Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire [Internet]. 2017. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-02/argumentaire_toxoplasmose_me_to.pdf
79. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. 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.* févr 1999;180(2 Pt 1):410-5
80. PLM-toxo-CAT-janvier2017.pdf [Internet]. [cité 28 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.societe-francaise-neonatalogie.fr/wp-content/uploads/2017/01/PLM-toxo-CAT-janvier2017.pdf>
81. Virkola K, Lappalainen M, Valanne L, Koskiniemi M. Radiological signs in newborns exposed to primary *Toxoplasma* infection in utero. *Pediatr Radiol.* févr 1997;27(2):133-8

82. Rorman E, Zamir CS, Rilkis I, Ben-David H. Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod Toxicol* Elmsford N. mai 2006;21(4):458-72.
83. Aspects échographiques des infections foetales< [Internet]. [cité 28 juin 2018]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/media/disquemiroir/2015-06-09/UNF3Smiroir/campus-numeriques/gynecologie-et-obstetrique/diuecho/poly/1700fra.html>
84. Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. janv 2001;94(1):37-45.
85. Kieffer F, Wallon M. Congenital toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013;112:1099-101.
86. Yera H. Diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale - ScienceDirect [Internet]. 2015 [cité 13 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773035X15300344>
87. CNR toxoplasmose. Recherche de Toxoplasmes dans le placenta : Recommandations techniques [Internet]. 2011. Disponible sur: http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2012/06/Recommandations-placenta-def_13102011.pdf
88. Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C, et al. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*. janv 2010;29(1):33-8
89. HAS mai 2017. Diagnostic biologique de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés [Internet]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-05/dir108/argumentaire_toxoplasmose_id.pdf
90. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, et al. 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*. juin 2001;39(6):2267-71.
91. Kieffer F, Wallon M, Garcia P, Thulliez P, Peyron F, Franck J. Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*. janv 2008;27(1):27-32.
92. Tan HK, Schmidt D, Stanford M, Teär-Fahnehjelm K, Ferret N, Salt A, et al. Risk of visual impairment in children with congenital toxoplasmic retinochoroiditis. *Am J Ophthalmol*. nov 2007;144(5):648-53.
93. Kodjikian L, Wallon M, Fleury J, Denis P, Biquet C, Peyron F, et al. Ocular manifestations in congenital toxoplasmosis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. janv 2006;244(1):14-21.
94. Phan L, Kasza K, Jalbrzikowski J, Noble AG, Latkany P, Kuo A, et al. Longitudinal study of new eye lesions in children with toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. *Am J Ophthalmol*. sept 2008;146(3):375-84.

95. Berrébi A, Assouline C, Bessières M-H, Lathière M, Cassaing S, Minville V, et al. Long-term outcome of children with congenital toxoplasmosis. *Am J Obstet Gynecol.* déc 2010;203(6):552.e1-6.
96. Binquet C, Wallon M, Quantin C, Kodjikian L, Garweg J, Fleury J, et al. Prognostic factors for the long-term development of ocular lesions in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Epidemiol Infect.* déc 2003;131(3):1157-68.
97. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C, et al. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics.* juin 2004;113(6):1567-72.
98. Fortier B, Coignard-Chatain C, Dao A, Rouland V, Valat AS, Vinatier D, et al. Étude des poussées cliniques évolutives et des rebonds sérologiques d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale et suivis durant les 2 premières années de vie. *Arch Pédiatrie.* 1 oct 1997;4(10):940-6
99. PROMEGA. Maxwell® RSC Instrument Operating Manual [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/maxwell-rsc-instrument-operating-manual.pdf>
100. LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR) PRINCIPE ET APPLICATIONS. <http://ecole-adn.id-alizes.net/uploads/2011/10/cours-PCR-C-SIATKA-COMPLET.pdf>. 2011.
101. Rappel sur le principe de la PCR [Internet]. ResearchGate. 2009. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Rappel-sur-le-principe-de-la-PCR-illustre-par-les-premiers-cycles-source-wikipedia_fig1_27814067
102. Glazer AN, Mathies RA. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Curr Opin Biotechnol.* févr 1997;8(1):94-102.
103. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. déc 2002;
104. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* nov 2000;38(11):4121-5
105. Rotorgene_Manual.pdf [Internet]. [cité 27 août 2018]. Disponible sur: https://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research_Groups/BF/instruments/Rotorgene_Manual.pdf
106. Bio Evolution. Mode d'emploi: coffret de PCR en temps réel « *Toxoplasma gondii* ». 2015.
107. Lebeau G. Mise au point de la PCR *Toxoplasma* sur placenta. Université Angers; 2017.
108. PROMEGA. Mode d'emploi Kit Maxwell RSC BLOOD DNA. 2018.
109. Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart M-P, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, et al. Multicentric comparative assessment of the bio-evolution *Toxoplasma gondii* detection kit with eight laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* janv 2015;53(1):29-34.

110. Richmond J. The 3Rs - Past, Present and Future | Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences [Internet]. [cité 13 août 2018]. Disponible sur: <http://sjlas.org/index.php/SJLAS/article/view/19>
111. Décret no 2001-464 du 29 mai 2001 modifiant le décret no 87-848 du 19 octobre 1987 pris pour l'application de l'article 454 du code pénal et du troisième alinéa de l'article 276 du code rural et relatif aux expériences pratiquées sur les animaux. 2001-464 mai 29, 2001.
112. Décret n° 2001-486 du 6 juin 2001 portant publication de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, adoptée à Strasbourg le 18 mars 1986 et signée par la France le 2 septembre 1987. 2001-486 juin 6, 2001.

ANNEXES

Annexe 1 : Résultats des PCR *Toxoplasma* des 93 échantillons de placentas et comparaison avec le résultat de l'inoculation ; en rouge : échantillons discordants entre le résultat de l'inoculation et la PCR *Toxoplasma* ; en bleu : résultats discordants avec le contexte clinique.

N° échantillon	Date échantillon	Contexte Clinique	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>
1	18/04/2008	TC	POSITIF	28,12 / 28,22
2	29/04/2008	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
3	26/11/2008	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
4	11/12/2008	Inconnu	POSITIF	33,98/ NEG
5	15/12/2008	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
6	18/12/2008	TC	POSITIF	24,45 / 25,23
7	09/02/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
8	11/02/2009	TC	POSITIF	NEG/33,52
9	06/03/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
10	09/03/2009	TC	POSITIF	31,06/36,15
11	17/03/2009	TC	POSITIF	34,60/36,01
12	18/03/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
13	22/03/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
14	25/03/2009	TC	POSITIF	27,23/28,10
15	15/04/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
16	18/04/2009	TC	POSITIF	NEG/ NEG
17	16/06/2009	TC	POSITIF	26,31 / 26,32
18	16/06/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
19	20/08/2009	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
20	24/08/2009	TC	POSITIF	26,63/25,88
21	25/08/2009	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
22	27/08/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
23	28/08/2009	TC	POSITIF	NEG/33,39
24	04/09/2009	TC	POSITIF	34,17/34,72
25	10/09/2009	TC	POSITIF	NEG/ NEG
26	12/09/2009	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
27	14/09/2009	Inconnu	POSITIF	25,35/26,14
28	21/09/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
29	22/09/2009	TC	NEGATIF	NEG/ NEG
30	22/09/2009	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
31	29/09/2009	Inconnu	POSITIF	26,86/28,69
32	11/11/2009	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
33	14/11/2009	TC	POSITIF	25,06/25,06
34	06/12/2009	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
35	13/12/2009	TC	POSITIF	25,50/25,84
36	04/02/2010	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
37	07/02/2010	Inconnu	POSITIF	28,28/31,81
38	27/02/2010	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
39	01/03/2010	Inconnu	POSITIF	24,60/24,11
40	17/03/2010	Inconnu	POSITIF	26,66/26,62
41	17/03/2010	Inconnu	POSITIF	NEG/34,60

N° échantillon	Date échantillon	Contexte Clinique	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>
42	18/03/2010	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
43	11/05/2010	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
44	05/06/2010	Inconnu	POSITIF	20,79/20,66
45	25/06/2010	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
46	28/06/2010	Inconnu	POSITIF	30,73/29,36
47	04/07/2010	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
48	07/07/2010	Inconnu	POSITIF	27,63/27,84
49	18/07/2010	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
50	21/07/2010	Inconnu	POSITIF	33,55/31,56
51	02/08/2010	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
52	06/08/2010	Inconnu	POSITIF	26,46/26,64
53	20/08/2010	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
54	25/08/2010	Inconnu	POSITIF	28,56/28,54
55	24/10/2010	Inconnu	POSITIF	33,65/NEG
56	31/10/2010	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
57	01/11/2010	Inconnu	POSITIF	28,38/30,06
58	15/11/2010	Inconnu	POSITIF	24,49/24,71
59	08/02/2011	Inconnu	POSITIF	26,82/25,47
60	10/02/2011	Inconnu	NEGATIF	33,82/NEG
61	11/06/2011	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
62	18/06/2011	TC	POSITIF	29,56/28,72
63	23/06/2011	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
64	02/07/2011	Inconnu	POSITIF	23,89/24,03
65	09/07/2011	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
66	06/08/2011	TC	POSITIF	NEG/NEG
67	24/09/2011	Absence de TC	NEGATIF	NEG/NEG
68	01/10/2011	TC	POSITIF	35,95/NEG
69	18/06/2012	TC	POSITIF	22,34/22,88
70	09/06/2015	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
71	11/06/2015	TC	POSITIF	29,57 / 29,40
72	01/07/2015	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
73	03/07/2015	TC	POSITIF	24,94 / 24,56
74	15/08/2015	Inconnu	NEGATIF	NEG/ NEG
75	18/08/2015	Inconnu	POSITIF	28,9 / 30,3
76	05/11/2015	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
77	19/11/2015	Inconnu	POSITIF	27,79 / 27,10
78	27/12/2015	Absence de TC	NEGATIF	NEG / NEG
79	13/01/2016	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
80	13/01/2016	TC	POSITIF	25,91/ 25,62
81	15/01/2016	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
82	02/02/2016	Inconnu	POSITIF	29,19 / 32,16
83	03/02/2016	TC	POSITIF	27,67 / 26,61
85	28/04/2016	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
86	28/04/2016	Inconnu	POSITIF	NEG/ NEG
87	01/08/2016	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
88	14/08/2016	TC	POSITIF	27,71/ 28,32
89	20/03/2017	Inconnu	NEGATIF	NEG / NEG

N° échantillon	Date échantillon	Contexte Clinique	Résultat inoculation	Ct PCR <i>Toxoplasma</i>
90	24/03/2017	TC	POSITIF	32,36 / 30,07
91	11/07/2017	Absence de TC	NEGATIF	NEG / NEG
92	04/08/2017	TC	NEGATIF	27,91/ 27,67
93	19/08/2017	Absence de TC	NEGATIF	NEG/ NEG
94	22/08/2017	TC	POSITIF	27,60 / 27,71

Annexe 2 : Mode d'emploi Maxwell RSC Instrument Quick Start Guide.

Maxwell® RSC Instrument Quick Start Guide
9167-DI-004 v 01

1  Appuyer sur Start pour commencer

2  Choisir un protocole et si nécessaire sélectionner la position des échantillons

3  Appuyer sur OK pour ouvrir la porte

4  Retirer le portoir

5  Positionner les cartouches et appuyer fermement pour les clipser

6  Retirer le film aluminium

7  Placer les plongeurs dans les puits 8, les échantillons dans les puits 1 et les tubes d'élution ouverts

8  Ajouter le tampon d'élution dans les tubes d'élution

Maxwell® RSC Instrument Quick Start Guide
9167-DI-004 v 01

9  Replacer le portoir dans l'automate

10  Sélectionner Start sur l'écran de la tablette

11  Quand l'extraction est terminée, appuyer sur Open Door

12  **AUX PROJECTIONS**
Retirer le portoir. Déclipser les cartouches par l'arrière et jeter les consommables

13  Les résultats s'affichent dans un rapport. Si besoin Appuyer sur Quantite pour doser avec le Quantus

14  Sélectionner l'échantillon à doser. Le préparer selon le protocole du Quantus Fluorometer

15  Placer l'échantillon dans le Quantus et fermer le couvercle

16  Le résultat s'affiche à l'écran sous le nom de l'échantillon.

p 2/2

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Pr Didier LEPELLETIER

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Dr Rose-Anne LAVERGNE

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascale JOLLIET

NOM : GUYONNAUD

PRENOM : CORALIE

Titre de Thèse :

Mise au point d'une approche par biologie moléculaire pour la détection de *Toxoplasma gondii* à partir de placenta dans l'aide au diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire responsable d'infection congénitale pouvant entraîner de graves lésions cérébrales et/ou oculaires fœtales. Actuellement au CHU de Nantes, la recherche de *Toxoplasma gondii* sur placenta se fait par une technique d'inoculation à la souris; cependant, une recherche directe de l'ADN parasitaire sur placenta par une technique de PCR pourrait constituer une avancée technologique dans l'aide au diagnostic de la toxoplasmose congénitale. L'objectif de ce travail de thèse est de mettre au point une technique de biologie moléculaire pour mettre en évidence l'ADN du parasite dans le placenta et de comparer les résultats avec ceux de la technique d'inoculation. Une première étape d'extraction de l'ADN à l'aide d'un kit commercial a été mise au point; la seconde étape a permis d'amplifier l'ADN de *Toxoplasma gondii* avec un kit de PCR en temps réel. Les résultats des 93 échantillons testés sont satisfaisants avec un taux de concordance de plus de 95% entre la PCR et l'inoculation. Il est nécessaire de continuer cette étude de manière prospective afin que la PCR remplace la méthode d'inoculation à des souris.

MOTS-CLES

TOXOPLASMA GONDII / TOXOPLASMOSE CONGENITALE / PLACENTA / PCR / INOCULATION SOURIS