

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2020

N° 2020-73

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Par Claire BARRAUD, épouse GAUDY née le 21/07/1989 à Courbevoie

Présentée et soutenue publiquement le 8 septembre 2020

Optimisation du diagnostic biologique
de la toxoplasmose congénitale en période néonatale :
biologie moléculaire et profil immunologique comparé

Président du jury :

Monsieur le Professeur Didier LEPELLETIER, PU-PH

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Rose-Anne LAVERGNE, PHU

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE, PU-PH

Monsieur le Professeur Damien MASSON, PU-PH

Madame le Docteur Cécile BOSCHER, PH

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury,

Monsieur le Professeur Didier LEPELLETIER,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Veuillez recevoir le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, et de m'avoir accueillie au sein de votre équipe. Veuillez trouver ici l'expression de mes respectueuses considérations.

Monsieur le Professeur Damien MASSON,

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Mon épanouissement au sein de la Biologie Médicale est né dans ton service et en grande partie grâce à toi. Merci de ton accompagnement, de ta présence tout au long de mon internat et de ta confiance.

Madame le Docteur Cécile BOSCHER,

Je vous remercie d'avoir accepté d'apporter votre expérience clinique à la critique de ce travail. Veuillez accepter ma plus grande considération.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Rose-Anne LAVERGNE,

Je te remercie de m'avoir fait confiance. Merci de ta disponibilité, de ton investissement personnel dans ce projet et de ta bienveillance constante à mon égard. Tes qualités professionnelles et humaines ont permis à ce travail de voir le jour de la manière la plus douce qui soit. Je te serais éternellement reconnaissante de m'avoir accompagnée dans cet accomplissement personnel.

A ces rencontres au sein de mon parcours,

Monsieur le Docteur Jérôme GOURNAY, Monsieur le Professeur Jaafar BENNOUNA, et Madame le Docteur Hélène SENELLART d'avoir su me guider vers un épanouissement professionnel complet et de m'avoir fait confiance.

Au laboratoire de Biochimie et à toute son équipe de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas de « babybio ».

A l'équipe de Parasitologie de Nantes, Rose-Anne, Fakhri, Sandra, Virginie, Aurélie, Christine, Cécile et Caroline de votre accueil toujours si chaleureux au sein de votre équipe, votre bienveillance, et l'amour de votre métier que vous nous transmettez au quotidien.

A l'équipe du laboratoire Biorylis des Sables d'Olonnes, de m'avoir ouvert vos portes et accueillie en confiance dans mes débuts de « biologiste privé » .

A mes amis,

La team P6, Camille, Mylène, Nesrine, Lorenzo, Benoit, Raphaël, Matthieu, Mélanie pour avoir rendu plus douce et légère la construction de notre avenir médical.

Maeva et Sarah, pour votre soutien et votre amitié depuis la Gastro Entérologie.

Jessica, pour m'avoir soutenue dans ces premiers mois de « découverte biologique » qui auraient été bien ternes sans ta présence.

Le CGPA's crew, Louise M & R, Antoine, Vincent, Martin et Cécile pour ce « brillantissime » semestre bactériologique à vos côtés, votre aide tout au long de ces 6 mois tumultueux, et votre amitié actuelle.

A Adélaïde et Sandra, pour l'amitié qui nous lie depuis cette rencontre « apérositologique » inédite, vos encouragements, votre soutien, vos conseils et nos futurs week-ends.

Marie et Clara, pour ces 6 mois « myélomateux » qui ont permis notre découverte.

Florian, Fanny, Elsa, Hélène, Anastasia pour votre présence à mes côtés depuis plusieurs années.

Les Zoulous and Co pour votre amitié fidèle après toutes ces années malgré la distance, pour tous ces moments passés, et tous ces futurs moments plus nombreux encore.

Aïcha, pour tous ces simples mots que tu sais me dire au bon moment, ton oreille attentive et ton amitié inébranlable depuis 15 ans.

A ma famille,

Papa, pour m'avoir donné ta force depuis tout là haut.

Maman, Anne Do, Charlotte, Grégoire, Jean Philippe, Hélène, Mamie, Manou et Bon Papa pour avoir toujours cru en moi, quelques soient les étapes et épreuves rencontrées.

Marc, Maryline, Alice et Lisa pour m'avoir d'emblée accueillie et choyée comme un membre de votre famille.

A toi Clément, sans qui rien n'aurait été possible

Et à Léonie, notre amour

TABLES DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	8
TABLE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
PARTIE 1 : TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. LE PARASITE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	14
A. Historique	14
B. Taxonomie	14
C. Stades parasitaires	15
1. Tachyzoïtes	15
2. Bradyzoïtes	16
3. Sporozoïtes	17
D. Cycle parasitaire	18
1. Généralités	18
2. Chez les hôtes intermédiaires	19
3. Chez l'hôte définitif	20
4. Devenir des kystes tissulaires	21
II. LA TOXOPLASMOSE	22
A. Mode de contamination de l'Homme	22
1. A partir des kystes tissulaires	22
2. A partir des oocystes	23
3. A partir des tachyzoïtes	24
B. Présentation clinique	25
1. Toxoplasmose de l'immunocompétent	25
2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé	25
3. Toxoplasmose oculaire	26
4. Toxoplasmose congénitale	27
C. Epidémiologie	30
D. Méthodes de diagnostic biologique	31
1. Généralités	31
2. Diagnostic indirect	31
3. Diagnostic direct	41
4. Diagnostic non biologique	44
E. Prise en charge actuelle	45
1. Généralités	45
2. Toxoplasmose hors toxoplasmose congénitale	46
3. Toxoplasmose congénitale	47
III. DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE	53
A. Diagnostic de la séroconversion maternelle	53
B. Méthodes diagnostiques biologiques de la toxoplasmose congénitale et interprétations	54
1. En période anténatale	54
2. A l'accouchement et en période néonatale	55
3. En période post natale	60

PARTIE 2 : TRAVAIL EXPERIMENTAL	61
I. ETUDE PROSPECTIVE COMPARATIVE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE A PARTIR DU PLACENTA : INOCULATION A LA SOURIS VERSUS BIOLOGIE MOLECULAIRE PAR qPCR	62
A. Introduction	62
B. Matériels et méthodes	63
1. Préparation des placentas	63
2. Mise au point du protocole	64
3. Etude prospective	64
C. Résultats	66
1. Mise au point du protocole	66
2. Etude prospective	67
D. Discussion	68
1. Mise au point du protocole	68
2. Etude prospective	69
E. Conclusion et perspective	70
II. EVALUATION DE L'APPORT DIAGNOSTIQUE DU PROFIL IMMUNOLOGIQUE COMPARE IGM MERE/ENFANT PAR RAPPORT AU DOSAGE QUANTITATIF DES IGM PAR TECHNIQUE ISAGA EN PERIODE NEONATALE	71
A. Introduction	71
B. Matériels et méthodes	72
1. Population étudiée et données recueillies	72
2. Interprétation de l'indice ISAGA IgM	72
3. Interprétation des PIC mère/enfant	73
C. Résultats	75
1. Caractéristiques des dossiers recueillis	75
2. Comparaison des résultats obtenus par la technique ISAGA versus PIC	75
3. Présentation des dossiers « discordants »	76
4. Indice ISAGA négatif avec PIC identique	79
D. Discussion	79
1. A propos de notre population générale	79
2. A propos de notre population d'intérêt ISAGA négatif	80
3. A propos des cas « discordants »	81
E. Conclusion et perspectives	83
III. ELABORATION D'UNE PLAQUETTE EXPLICATIVE ET COMMUNICATION AUPRES DES SERVICES CLINIQUES	85
CONCLUSION	88
ANNEXE	89
BIBLIOGRAPHIE	96

TABLE DES FIGURES

PARTIE 1

Figure I-1 : <i>Ctenodactylus gundi</i>	14
Figure I-2 : Ultrastructure d'un tachyzoïte	15
Figure I-3 : Tachyzoïte sur frottis et division nucléaire en cours	16
Figure I-4 : Kystes de <i>T. gondii</i> après coloration argentique et Giemsa ou colorations PAS	17
Figure I-5 : Oocyste non sporulé à l'état frais	17
Figure I-6 : Oocyste sporulé en microscopie électronique.	18
Figure I-7 : Cycle parasitaire et modes de contamination de <i>T. gondii</i>	19
Figure I-8 : Huit stades de la reproduction asexuée	21
Figure II-1 : Toxoplasmose cérébrale	26
Figure II-2 : Chorioretinite	27
Figure II-3 : Dilatation ventriculaire en échographie	28
Figure II-4 - Risque de manifestations cliniques chez les enfants atteints de toxoplasmose congénitale en fonction de l'âge gestationnel au moment de la séroconversion	29
Figure II-5 : Cinétique des anticorps	32
Figure II-6 : Exemple d'interprétation d'un test d'agglutination	34
Figure II-7 : Illustration de la technique ISAGA	35
Figure II-8 : Test d'immunofluorescence indirecte	35
Figure II-9 : Principes des tests ELISA indirects et en sandwich	36
Figure II-10 : Immunoblot de confirmation	39
Figure II-11 : Principe du test immunochromatographique	41
Figure II-12 : Principe de la PCR en temps réel avec sonde TaqMan	43
Figure II-13 : Principe de la technique "LAMP"	44
Figure II-14 : Dilatation ventriculaire en IRM	45
Figure III-1 : Conduite à tenir devant les examens néonataux d'un enfant né d'une mère ayant eu une séroconversion toxoplasmique pendant la grossesse	56
Figure III-2 : Immunoblot de comparaison mère et enfant à la naissance	58

PARTIE 2

Figure I-1 : Protocole définitif de pré-traitement des échantillons de placenta	63
Figure I-2 : Courbes d'amplification d'une PCR en temps réelle.	65
Figure II-1 : Interprétation et calcul de l'indice ISAGA	73
Figure II-2: Exemple d'un PIC négatif	73
Figure II-3 : Exemple de PIC identique	74
Figure II-4 : Exemple de PIC positif	74
Figure II-5 : Nombre de PIC recueillis au CHU de Nantes de 2014 à novembre 2019	75
Figure II-6 : PIC du dossier de l'enfant 1	77
Figure II-7 : PIC mère/enfant IgM de l'enfant 2	78
Figure II-8 : PIC mère/enfant IgM de l'enfant 3	79

TABLE DES TABLEAUX

PARTIE 1

Tableau I-1 : Classification taxonomique simplifiée de <i>T. gondii</i>	15
Tableau II-1 : Règles hygièno-diététiques à destination des femmes enceintes non immunisées par <i>T. gondii</i>	48

PARTIE 2

Tableau I-1 : Résultats PCR <i>versus</i> Inoculation à la souris durant l'étape de mise au point	66
Tableau I-2 : Tableau comparatif des résultats PCR Toxoplasme, inoculation à la souris et PCR Albumine au cours de notre travail expérimental.	67
Tableau II-1 : Résultats des PIC IgM en fonction des scores ISAGA IgM de notre population	75
Tableau II-2 : Résultats des PIC IgM avec score ISAGA négatif	76
Tableau II-3 : Résultats biologiques de l'enfant 1, de sa naissance à son 32 ^{ème} jour de vie	76
Tableau II-4 : Résultats biologiques de l'enfant 3, de sa naissance à son 6 ^{ème} mois de vie	78
Tableau II-5 : Résultats biologiques de l'enfant 3, de sa naissance à son 12 ^{ème} mois de vie	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CNR : Centre national de référence
CMV : Cytomégalovirus
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
Ct : Cycle threshold
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EBV : Epstein Barr Virus
FO : Fond d'Oeil
G6PD : Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase
HAS : Haute Autorité de Santé
IF : Immunofluorescence
IFA : Immunofluorescence Assa
IFI : Immunofluorescence Indirecte
IgA : Immunoglobuline de type A
IgE : Immunoglobuline de type E
IgG : Immunoglobuline de type G
IgM : Immunoglobuline de type M
INVS : Institut National de Veille Sanitaire
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISAGA : Immuno-Sorbent Agglutination Assay
LA : Liquide Amniotique
LAMP : Loop-mediated isothermal amplification
NFS : Numération Formule Sanguine
PIC : Profil Immunologique Comparé (mère/enfant)
PCR : Polymerase Chain Reaction
PS : Pyriméthamine Sulfadiazine
qPCR : PCR en temps réel
SA : Semaines d'Aménorrhée
SIDA : Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
SC : Séroconversion
SG : Semaines de grossesse
TC : Toxoplasmose Congénitale
VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

L'agent pathogène *Toxoplasma gondii*, parasite protozoaire, est responsable de la toxoplasmose, zoonose cosmopolite. Habituellement sans gravité pour l'adulte immunocompétent, cette infection peut se montrer redoutable en cas d'atteinte de sujets à risque. En cas d'atteinte fœtale, elle est appelée toxoplasmose congénitale.

La toxoplasmose congénitale touche les enfants nés dans un contexte de séroconversion maternelle toxoplasmique au cours de la grossesse. Le risque de contamination fœtale après séroconversion est d'environ 30 % (1) mais il varie avec la date de l'infection maternelle, en augmentant régulièrement du début à la fin de la grossesse. Elle peut alors être responsable de complications sévères, cérébrales, oculaires ou encore viscérales.

Le programme de prévention, détection et prise en charge thérapeutique de la toxoplasmose congénitale est bien codifié en France. Depuis 1992 (*décret 92-114 du 14 février 1992*) un suivi sérologique mensuel des femmes enceintes non immunisées vis-à-vis de *T. gondii* est recommandé ainsi que le respect de mesures hygiéno-diététiques. En cas de séroconversion toxoplasmique pergravidique, la prise en charge du couple mère/enfant est axée sur une chimioprophylaxie secondaire pour prévenir la transmission materno-fœtale mais surtout sur la recherche d'une atteinte fœtale confirmant ou non le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

Actuellement, les méthodes diagnostiques de la toxoplasmose congénitale sont nombreuses et reposent essentiellement sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques. Le diagnostic biologique se focalise sur la recherche de *T. gondii* chez le fœtus en per partum ou chez l'enfant en période néonatale. Cette recherche se fait par la mise en évidence du parasite de façon directe au sein du liquide amniotique ou du placenta par exemple, ou de façon indirecte, par étude de la réaction immunitaire de l'enfant à la naissance.

L'objectif de cette thèse est d'optimiser le diagnostic de toxoplasmose congénitale en période néonatale au CHU de Nantes, en se focalisant sur deux axes principaux.

Le premier axe s'intéresse à l'étude des placentas. Elle se fait actuellement par analyse de sérum de souris, 4 semaines après l'inoculation d'un lysat de placenta. A partir d'une cohorte rétrospective, le travail de thèse de Coralie GUYONNAUD (2) a permis de mettre au point un protocole d'analyse des placentas par qPCR et de montrer l'apport de la biologie moléculaire dans l'aide au diagnostic de la toxoplasmose congénitale. Notre objectif a été de valider les conclusions de ce travail, par une étude prospective afin de supprimer définitivement la technique d'inoculation à la souris.

Le second axe se porte sur l'étude de la réponse immunitaire en période néonatale de l'enfant suspecté d'être atteint de toxoplasmose congénitale. Plusieurs techniques sont utilisées actuellement à cette fin, notamment la recherche d'IgM par technique ISAGA et les profils comparés immunologiques mère/enfant. Le but de notre travail a été d'optimiser la place du profil comparé IgM par rapport au dosage des IgM par technique ISAGA.

Après une première partie portant sur une revue bibliographique des connaissances actuelles sur la toxoplasmose et son agent causal, nous exposerons le travail expérimental mené dans le but d'optimiser le diagnostic biologique de toxoplasmose congénitale dans le laboratoire de Parasitologie du CHU de Nantes.

PARTIE 1 :

Travail bibliographique

I. LE PARASITE *TOXOPLASMA GONDII*

Découvert en 1908, *Toxoplasma gondii* est un parasite ubiquitaire protozoaire, responsable de la toxoplasmose, zoonose cosmopolite fréquente pouvant toucher aussi bien les mammifères à sang chaud que les oiseaux (3).

A. Historique

C'est en 1908, chez un rongeur, le *Ctenodactylus gundi* (Figure I-1) que *Toxoplasma gondii* fut observé pour la première fois à Tunis par Nicolle et Manceaux. Ils le nommèrent un an plus tard *T. gondii* en raison de sa morphologie : « toxo » signifiant arc et « plasma » signifiant forme en grec (4).



Figure I-1 : *Ctenodactylus gundi* (Banque d'image Sysbio de l'université de Lille)

Ce n'est que 30 ans après, en 1937 et 1939 que le protozoaire a respectivement été isolé chez un animal (5) puis chez un humain (6) avant que ces deux protozoaires soient reconnus comme identique, et possédant un rôle pathogène propre.

Les études sur *T. gondii* continuèrent, avec plus récemment l'achèvement de la cartographie complète du génome de *T. gondii* en 2005 (7). L'analyse (8) de 275 isolats provenant de gallinacés domestiques tout autour du monde a aussi mis en évidence récemment sa grande variabilité génétique.

B. Taxonomie

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire, appartenant à l'embranchement Apicomplexa (9).

Les apicomplexes sont des parasites intracellulaires obligatoires, comprenant notamment les genres *Plasmodium*, *Eimeria* ou encore *Theileria*, responsables respectivement du paludisme, de coccidioses animales et de la theilériose. *Hammondia hammondi* reste certainement l'apicomplexe le plus proche de *T. gondii*, cependant responsable d'aucune infection chez l'Homme (10).

Comme ces parasites, *T. gondii* est caractérisé par la présence d'un complexe apical (comprenant un conoïde, et deux organites de sécrétion, les micronèmes et les rhoptries) permettant l'entrée du parasite au sein de la cellule hôte par l'intermédiaire des antigènes de surface (11).

A noter que *T. gondii* est la seule espèce du genre *Toxoplasma* (Tableau I-1).

Règne	Protozoaires
Embranchement	<i>Apicomplexa</i>
Classe	<i>Conoidasida</i>
Ordre / Sous ordre	<i>Eucoccidiorida / Eimeriorina</i>
Famille / Sous famille	<i>Sarcocystidae / Toxoplasmatin</i>
Genre	<i>Toxoplasma</i>
Espèce	<i>Toxoplasma gondii</i>

Tableau I-1 : Classification taxonomique simplifiée de *T. gondii* (12)

C. Stades parasitaires

Il existe trois stades infectieux parasitaires de *T. gondii* : les tachyzoïtes, les bradyzoïtes au sein des kystes tissulaires, et les sporozoïtes dans les oocystes (4,9). Ces stades diffèrent très peu les uns des autres, tant sur le plan morphologique que structurel (Figure I-2). Ce sont leurs organites intracellulaires et leur ultra structure, qui donnent à chaque stade ses caractéristiques spécifiques (13).

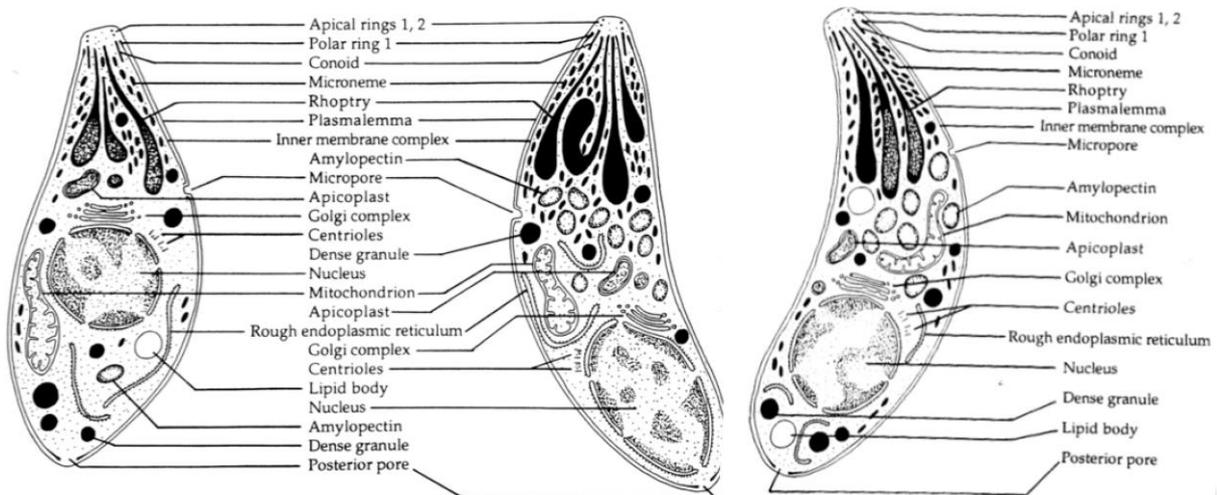


Figure I-2 : Ultrastructure d'un tachyzoïte (à gauche) d'un bradyzoïte (au centre) et d'un sporozoïte (à droite) de *T. gondii* (13)

1. Tachyzoïtes

Appelés aussi trophozoïtes, ou endozoïtes, il s'agit du stade où le parasite a été décrit pour la première fois par Nicolle et Manceaux en 1908 (4). C'est la forme végétative de dissémination à division rapide (du grec « tachy » = rapide). Sa forme est arquée, lunaire, de 6 à 8 μm de long et 3 à 4 μm de large (Figure I-3).

Leur structure est caractérisée par une extrémité antérieure pointue, dite conoïdale, et une extrémité postérieure arrondie. Le noyau est volontiers central (Figure I-2) et le cytoplasme contient de multiples organites (réticulum endoplasmique, granules denses, système microtubulaire, rhoptries etc.) dont le rôle reste parfois encore inconnu (13).

Forme intracellulaire stricte, il peut envahir l'ensemble des cellules des animaux homéothermes, notamment les monocytes/macrophages, dans lesquels il se divise par endodyogénèse au sein d'une vacuole parasitophore (14).

Le stade infectant tachyzoïte est celui qui est responsable de la dissémination de l'infection au sein de l'organisme hôte, le plus souvent au cours de la phase aiguë de l'infection (15). Celle-ci survient soit après ingestion des autres formes infestantes, ou très exceptionnellement directement après ingestion de tachyzoïtes (16).

Il est à l'origine de l'ensemble des infections des organes, y compris celle du placenta chez une femme enceinte. Il s'agit donc du stade pouvant être à l'origine de la transmission materno-fœtale et de la toxoplasmose congénitale (9).

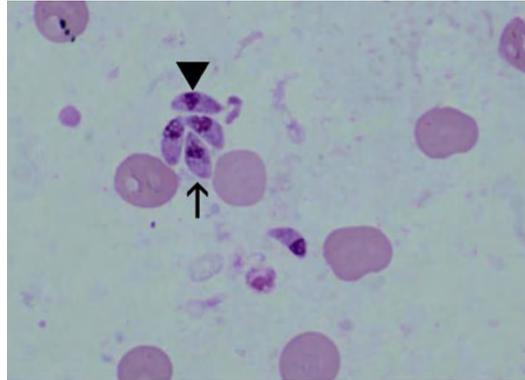


Figure I-3 : Tachyzoïte sur frottis (tête de flèche) et division nucléaire en cours (flèche) (17)

2. Bradyzoïtes

Il s'agit de la forme tissulaire, à division lente (du grec « brady » = lent) résultant de l'évolution des tachyzoïtes. Ils mesurent environ 7 μm par 1,5 μm (13) et ne diffèrent que peu des tachyzoïtes (Figure I-2). Ils possèdent cependant des granules « Periodic Acid Schiff » positives à la coloration PAS (Figure I-4), de nombreuses granules d'amylopectines et un noyau en position terminale (18).

Appelée aussi cystozoïte, cette forme parasitaire se trouve au sein de kystes tissulaires (Figure I-4) préférentiellement situés dans le tissu cérébral, musculaire et rétinien. Les kystes se développent dans les cellules hôtes et peuvent contenir plusieurs milliers de bradyzoïtes, le nombre de bradyzoïtes augmentant avec l'âge du kyste. Ils peuvent atteindre plus de 100 μm , avec une morphologie plus ou moins longue selon leur localisation (forme longue dans le tissu musculaire et forme sphérique dans le tissu cérébral). Ces kystes persistent dans l'organisme après une primo-infection, les bradyzoïtes peuvent donc être retrouvés au cours des stades d'infection chronique (4,15).

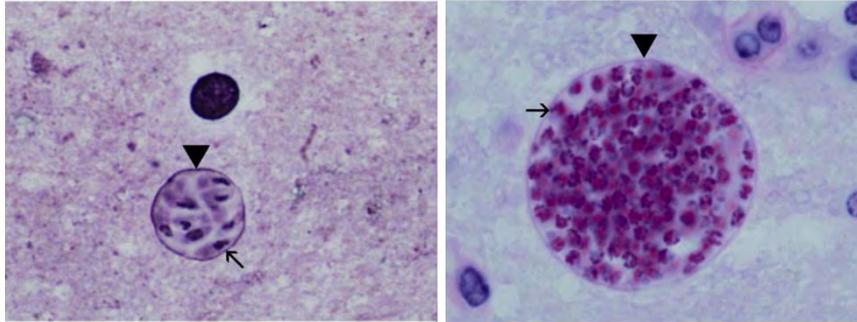


Figure I-4 : Kystes de *T. gondii* après coloration argentique et Giemsa (à gauche) ou colorations PAS (à droite) montrant la paroi du kyste (tête de flèche) et les bradyzoïtes (flèche) (17)

La caractéristique majeure de ce stade a été mise en évidence dans les années 1960 par Jacobs, Remington et Melton. Ils ont montré que la paroi du kyste est détruite par la trypsine ou pepsine, mais que les bradyzoïtes sont eux résistants à la digestion par les sucs gastriques, à la différence des tachyzoïtes qui sont rapidement détruits par ces derniers. Il existe donc un rôle de transmission par les kystes, dits infectants après ingestion (19). Leur pouvoir infectant est reconnu comme étant bien plus important que celui des tachyzoïtes (20).

3. Sporozoïtes

Les sporozoïtes représentent la forme environnementale du parasite, contenue dans les oocystes matures, dits sporulés. Morphologiquement proche du tachyzoïte (Figure I-2), ils sont le résultat de la reproduction sexuée qui a lieu chez l'hôte définitif (les félinés) à partir des autres stades parasitaires, notamment après ingestion de kystes tissulaires.

Morphologiquement, les oocystes non sporulés (Figure I-5) sont sphériques, et mesurent entre 10 et 12 μm de diamètre. Après leur excrétion dans les déjections des félinés et une maturation de 1 à 5 jours dans le milieu extérieur, ils deviennent des oocystes sporulés et donc infestant.



Figure I-5 : Oocyste non sporulé à l'état frais (17)

Les oocystes sporulés (Figure I-6) ont une forme subsphérique voir ellipsoïdale, et mesurent près de 12 μm de diamètre. Chacun de ces oocystes contient 2 sporocystes, contenant eux-mêmes 4 sporozoïtes à l'issue de multiples divisions nucléaires (21).

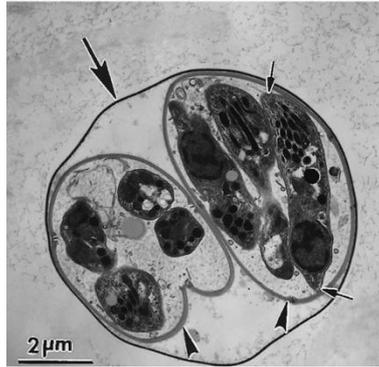


Figure I-6 : Oocyste sporulé en microscopie électronique.
Membrane extérieure (grande flèche) enveloppant deux sporocystes (tête de flèche)
enfermant 4 sporozoïtes (petites flèches) (13)

Leur paroi est résistante aux sucs gastriques, ce qui leur donne un pouvoir infestant par voie orale (22).

D. *Cycle parasitaire*

1. Généralités

Le cycle parasitaire de *T. gondii* se déroule chez un hôte définitif d'une part, les félinés dont le chat, qui héberge la reproduction sexuée du parasite et un hôte intermédiaire d'autre part, les animaux à sang chaud, dits homéothermes, qui eux hébergent la reproduction asexuée (23). La particularité de ce cycle est la possibilité de transmission du parasite par carnivorerisme entre hôtes intermédiaires sans intervention de l'hôte définitif, par un processus de multiplication asexuée (24).

C'est en 1970, à la suite de la découverte du cycle de *T. gondii*, que les modes de contamination de la toxoplasmose ont enfin pu être compris (Figure I-7) (4,17).

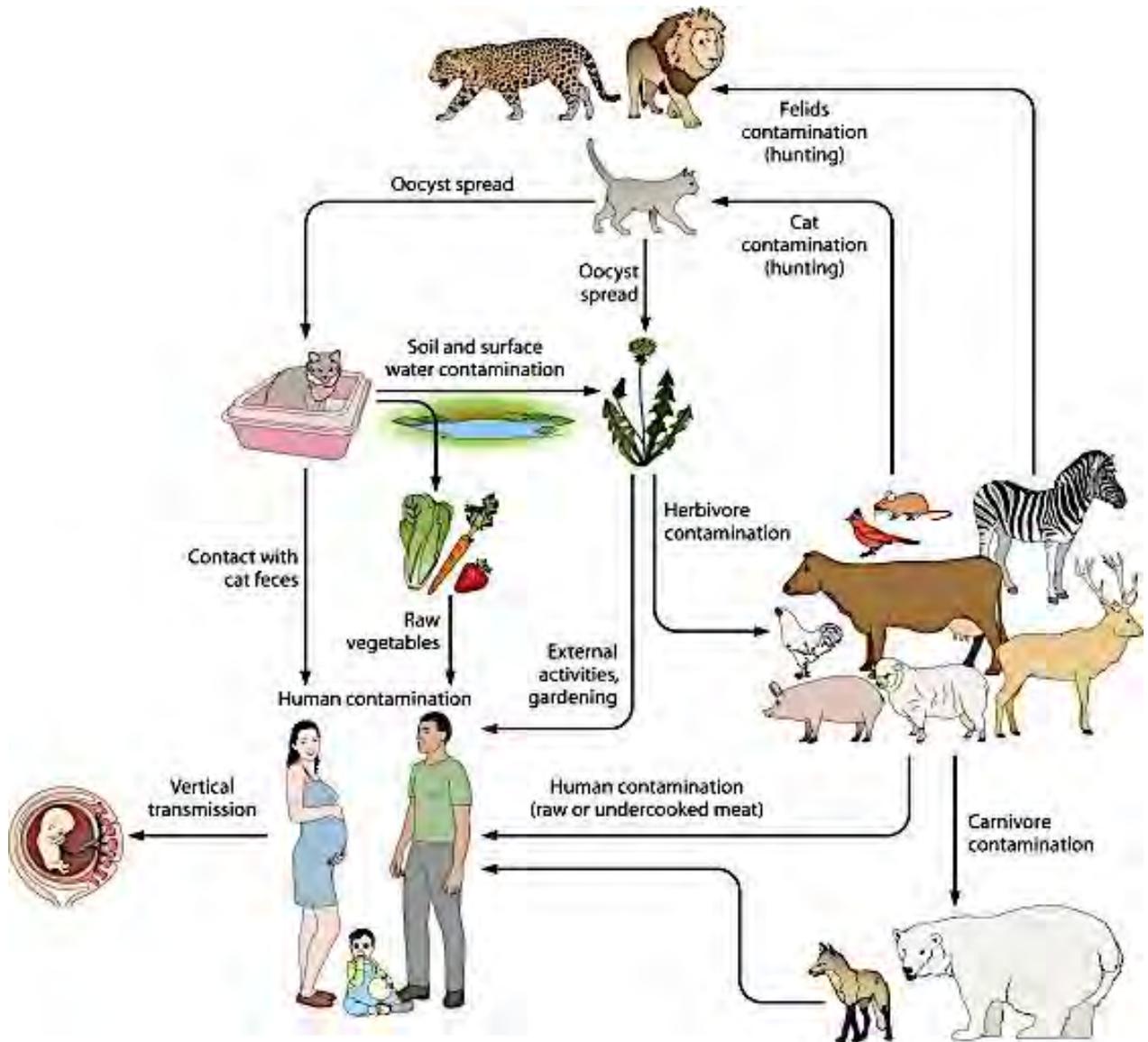


Figure I-7 : Cycle parasitaire et modes de contamination de *T. gondii* (9)

2. Chez les hôtes intermédiaires

a) Contamination

(1) A partir des sporozoïtes

Les sporozoïtes contenus dans les oocystes ingérés par les hôtes intermédiaires, se retrouvent dans les entérocytes de l'intestin grêle environ 30 minutes après leur ingestion (25). La plupart d'entre eux ont formé une vacuole parasitophore. Ils pénètrent secondairement la lamina propria intestinale, et évoluent alors en tachyzoïtes qui envahissent et infectent à leur tour les cellules endothéliales puis les cellules sanguines (26). Ce processus dure en moyenne 2 à 3 jours et peut aboutir à l'infection de multiples organes, selon le statut immunitaire du patient (15).

(2) A partir des bradyzoïtes

L'ingestion de bradyzoïtes, via les kystes tissulaires, par les hôtes intermédiaires, est moins pathogène que l'ingestion d'oocystes (27). Une fois ingérés, ils évoluent en

tachyzoïtes dans la lamina propria de l'intestin grêle, qui envahissent alors les organes, par dissémination. La parasitémie est alors détectable, au bout de 24h en moyenne, et des kystes tissulaires sont formés en 5-6 jours (15).

b) Evolution des tachyzoïtes

Les tachyzoïtes sont capables d'envahir toutes cellules nucléées par phagocytose ou par fusion de leur membrane cellulaire (paroi externe) avec celle de la cellule hôte, les monocytes/macrophages habituellement. Après leur pénétration, ils prennent une forme ovoïde et se nichent dans une vacuole parasitophore (13). Au sein de celle-ci, ils survivent et se multiplient librement car à l'abri des lysosomes et de l'acidité de la cellule hôte (28). Leur multiplication par endodyogénèse puis leur différenciation en bradyzoïtes au sein de cette vacuole, conduit à la formation de kystes, créés à partir des composants externes de cette vacuole. Cette différenciation est corrélée dans le temps à l'apparition de l'immunité protectrice de l'hôte. Les bradyzoïtes, contenus dans les kystes vont ensuite persister dans l'organisme de l'hôte (29).

3. Chez l'hôte définitif

Dubey (15,20,25,30) a permis de connaître avec précision le cycle parasitaire au sein de l'hôte définitif, les félinés.

Comme dit précédemment, l'infection des hôtes définitifs se fait principalement après ingestion de kystes tissulaires, plus rarement après ingestion d'oocystes voire de tachyzoïtes. Dans 2 études de 1996, on retrouve des oocystes dans les excréments des chats dans seulement 30% des cas après ingestion d'oocystes ou de tachyzoïtes, mais dans près de 100% des cas après ingestion de bradyzoïtes contenus dans les kystes (34,35). Après l'ingestion de kystes par l'hôte définitif au cours d'un repas (petits mammifères, souris) la paroi de celui-ci est rompue par les enzymes gastriques. Il y a alors libération de bradyzoïtes, qui pénètrent les cellules entéro-épithéliales. S'en suit la reproduction asexuée de *T. gondii* (Figure I-8) qui comprend cinq stades successifs morphologiques (de A à E) et dure de 3 à 15 jours avant de conduire à la gamétogénèse. Le stade A correspond à des tachyzoïtes ; les stades B à E correspondent à des schizontes contenant des mérozoïtes (31).

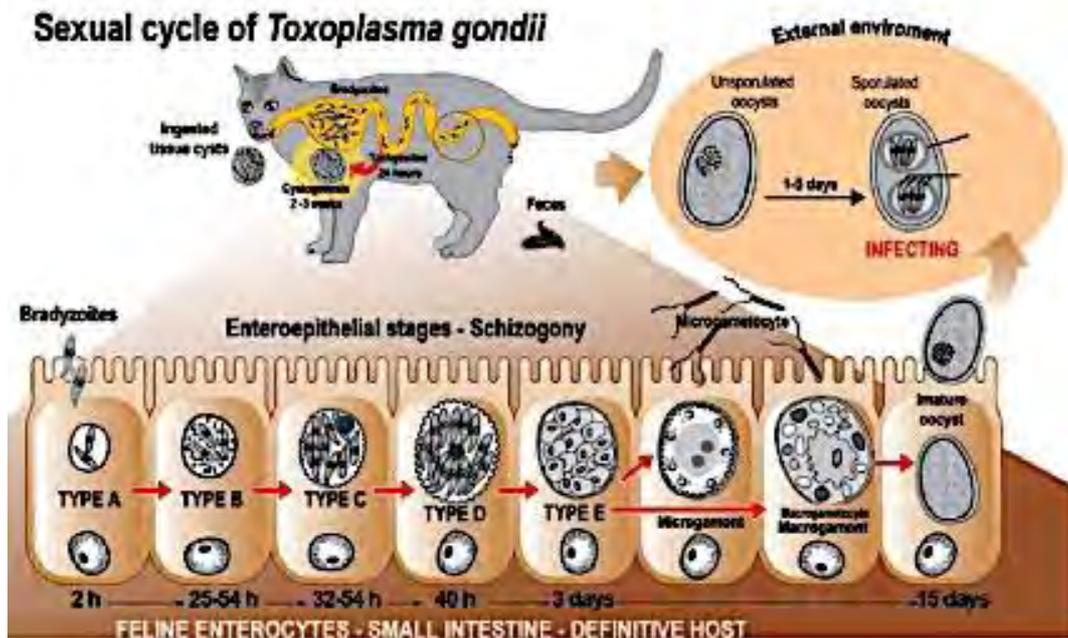


Figure I-8 : Huit stades de la reproduction asexuée (31-33)

Au cours de la gamétogenèse, les mérozoïtes se différencient en gamétoocytes mâles et femelles. Les gamétoocytes se divisent de nombreuses fois pour devenir des microgamètes mâles doués de motilité ou des macrogamètes femelles.

Pendant la reproduction sexuée, un microgamète mâle va féconder un macrogamète femelle, permettant la formation d'un zygote, futur oocyste. Cet oocyste est libéré de la cellule intestinale, puis excrété, non sporulé, dans les déjections de l'hôte définitif (33). L'émission de ces oocystes se fait habituellement 3 à 10 jours après l'ingestion de kystes.

4. Devenir des kystes tissulaires

La présence de kystes tissulaires est à l'origine de la phase chronique de l'infection mais ils sont formés dès la phase aiguë : 2-3 jours après injection parentérale de tachyzoïtes, 5-6 jours après ingestion de bradyzoïtes, et 6-7 jours après ingestion d'oocystes (25,27). Leur localisation et leur nombre dépendent à la fois de l'hôte et de la souche de *T. gondii*. On en retrouve davantage au niveau cérébral chez les petits mammifères, et plus au niveau viscéral et musculaire chez les mammifères plus grands (homme, mouton, chat etc.) (13,36).

Présent au sein de ces divers tissus, ces kystes y restent probablement durant toute la vie de l'hôte (20). Au cours de cette vie, des réactivations peuvent s'opérer avec plus ou moins de manifestations cliniques selon le statut immunitaire de l'hôte. Le mécanisme de cette réactivation reste cependant encore inconnu (15).

II. LA TOXOPLASMOSE

La toxoplasmose est une zoonose cosmopolite, induite par l'infection d'un hôte par le parasite *Toxoplasma gondii*. Il s'agit la plupart du temps d'une maladie bénigne, mais qui peut dans certains cas, avoir de graves conséquences, potentiellement fatales chez des sujets à risques.

A. *Mode de contamination de l'Homme*

Les modes de transmission de la toxoplasmose ont été mis en évidence à partir des années 1970 (4,17).

L'ingestion d'eau ou de nourriture contaminées par des oocystes environnementaux émis par les chats, et l'ingestion de viande mal cuite contenant des bradyzoïtes au sein des kystes tissulaires, sont les deux modes de contamination les plus fréquents (hors toxoplasmose congénitale). Les proportions relatives à ces deux modes de contamination restent inconnues et dépendent de nombreux facteurs (type de population, géographie etc.) (9).

1. **A partir des kystes tissulaires**

Deux origines d'infection à partir des kystes tissulaires sont reconnues : la consommation de viandes peu ou mal cuites, et la transplantation d'organe solide.

a) **Par consommation de viande**

La consommation de viande insuffisamment cuite, issue de tout animal homéotherme infecté par *T. gondii*, est à risque de transmission du parasite chez l'Homme. Ce risque dépend du pays et des habitudes alimentaires. Dans une étude de 2009 menée aux Etats-Unis, le risque est reconnu plus élevé après consommation de viande d'agneau (Odds ratio corrigé (ORc) 8,39 ; risque attribué (RA) 20%), de viande de bœuf crue (ORc 6,67 ; RA 7%), de toute viande séchée ou fumée localement (ORc 1,97 ; RA 22%) (37).

Il semblerait d'après plusieurs études que le risque reste cependant faible pour le bœuf, le porc et le poulet dans les pays industrialisés, sans doute grâce au traitement et à la surveillance des viandes avant leur commercialisation, réduisant la viabilité des kystes tissulaires. Il n'en est par contre pas toujours le cas dans les pays où le mouton et l'agneau sont les viandes les plus consommées (38,39).

Différents moyens ont été reconnus efficaces dans la destruction des kystes tissulaires. Une congélation à -12°C pendant au minimum 3 jours (ou plus en fonction de l'épaisseur de viande) (19) ainsi qu'une cuisson à 67°C (4 min à 60°C, ou 10 min à 50°C) (40) sont jugées comme indispensables pour détruire le parasite afin de réduire le risque de contamination. D'autres moyens ont aussi été mis en évidence, mais difficilement applicables pour une consommation humaine quotidienne (irradiation *gamma*, injection de potassium, ou lactate de sodium etc.) (9).

b) **Après greffe d'organe solide**

Dans des cas plus restreints, il existe un risque de transmission du parasite en cas de transplantation d'un organe solide envahi par des kystes, à un receveur non immunisé.

Ce risque est dépendant de l'organe transplanté, plus ou moins sujet à être envahi par des kystes tissulaires. La greffe cardiaque est par exemple davantage à risque que les greffes pulmonaires, hépatiques ou rénales (41).

Cependant, l'incidence est très variable, de 9 à 56% selon les études, car elle dépend de la prévalence de la toxoplasmose dans le pays en question, et surtout des habitudes thérapeutiques en vigueur (présence ou non de chimioprophylaxie post greffe) (42).

2. A partir des oocystes

La durée et la prévalence d'excrétion des oocystes non infectants par les félidés, sont faibles. Cette excrétion conduit cependant à l'émission de plusieurs milliers d'oocystes non sporulés devenant infectants en moins de 4 jours dans certaines litières, et pouvant rester viables pendant près de 15 jours avant leur sporulation. La sporulation peut être évitée par une congélation à -6°C pendant 7 jours ou après exposition à 37°C une journée (43).

Une fois sporulés, ces oocystes sont très résistants dans le milieu extérieur, et peuvent survivre pendant plus d'un an dans des conditions idéales de température et d'humidité. Les conditions climatiques d'un pays sont l'un des facteurs prédominants influençant la résistance et la survie des oocystes sporulés dans le milieu extérieur. Il a d'ailleurs été montré en Colombie une augmentation de l'incidence de la toxoplasmose congénitale au cours de la saison des pluies (temps chaud et humide) (44). En laboratoire, certains oocystes sporulés ont même été conservés pendant 54 mois à 4°C, et pendant 106 jours à -10°C. Ils sont cependant détruits après 1 à 2 minutes à 55-60°C, mais la congélation n'a aucun effet sur eux, même à -20°C. Leur paroi les rend résistants aux désinfectants usuels (eau de Javel) et aux sucs gastriques (22).

La contamination par les oocystes peut toucher l'eau, mais aussi le sol, les fruits ou les végétaux tous confondus.

a) Par ingestion d'eau contaminée

Dans l'eau, les oocystes peuvent rester viables de longues périodes et résister à de basses comme de hautes températures. De même, ils ne sont pas détruits par les produits utilisés dans les usines de traitements des eaux de consommation, notamment l'ozone et la chloration, mais ils restent sensibles aux traitements par les UVs (45). Plusieurs épidémies par ingestion d'eau contaminée ont été rapportées, le plus souvent concomitantes à une saison des pluies dans des pays avec climat tropical (Brésil, Colombie, Inde) (9).

En France, les eaux contaminées par des oocystes peuvent être retrouvées au niveau de puits peu profonds d'exploitations agricoles avec hygiène médiocre (46). Une corrélation positive a été observée entre la consommation de ces eaux non bouillies et la présence d'une population immunisée pour la toxoplasmose.

Les mollusques et crustacés sont quant à eux reconnus comme des filtres naturels, concentrant les oocystes de *T. gondii*, et sont ainsi déconseillés pendant la grossesse (37).

b) Par ingestion de légumes et fruits contaminés

Une étude européenne rapporte qu'entre 6 et 17% des infections toxoplasmiques sont dues à l'ingestion de végétaux et fruits en contact avec le sol (47), pourcentage volontiers augmenté chez les enfants (32). Bien que peu de données soient disponibles, il semble que l'eau et le sol contaminés puissent servir de vecteurs pour le transfert d'oocystes à la surface des légumes et des fruits destinés à la consommation. Effectivement, il a été montré un risque d'infection accru en cas de consommation de légumes ou fruits exportés, non lavés, notamment chez les femmes enceintes (9) et en cas de consommation de salades prêtes à consommer (48).

3. A partir des tachyzoïtes

D'un point de vue épidémiologique, ce mode de contamination est le moins fréquent. Cela s'explique par la fragilité de ce stade infectant, qui est facilement détruit par les enzymes digestives (en moins de 10 minutes) et dans le milieu extérieur. On sait par exemple qu'il est détruit par l'eau pure, mais qu'il peut persister plusieurs jours dans des liquides physiologiques comme le lait non pasteurisé à 4°C (24).

a) Par transmission materno-fœtale

Les tachyzoïtes sont la forme infectante du parasite responsable de la toxoplasmose congénitale, par transmission verticale. Lors d'une infection aiguë chez la femme enceinte, la phase de dissémination conduit à l'invasion de différents organes par les tachyzoïtes, notamment le placenta. C'est par l'intermédiaire de celui-ci que le parasite gagnera le fœtus. La fréquence de la transmission verticale du parasite au fœtus est d'autant plus haute que l'âge gestationnel est élevé (49).

b) Par consommation de lait non pasteurisé

Il a été décrit des cas de toxoplasmose acquise après consommation de lait de chèvre non pasteurisé (12) faisant de cette forme parasitaire un facteur de risque d'infection, toutefois très peu fréquent (37).

A noter qu'une infection par l'allaitement maternel est suspectée mais n'a jamais été prouvée (51).

c) Par injection parentérale

Il a aussi été décrit des cas d'infection dus à une contamination par injection, lors d'accidents d'exposition au sang par exemple. Cela est possible seulement au moment de la phase aiguë de l'infection, où une parasitémie est détectable. La durée de cette phase de dissémination dépend à la fois de la souche et de la réponse immune de l'hôte, pouvant aller jusqu'à 5 semaines après l'infection (50).

B. *Présentation clinique*

1. *Toxoplasmose de l'immunocompétent*

Dans plus de 80% des cas, la primo-infection à *T. gondii* reste asymptomatique chez les patients immunocompétents en Europe et en Amérique du Nord (52).

Les 20% restants présentent habituellement un tableau peu spécifique, alliant des polyadénopathies, notamment cervicales, à un syndrome pseudo-grippal (asthénie, fièvre, myalgies diffuses) pouvant durer plusieurs semaines. Il s'agit d'une clinique assez semblable à la mononucléose infectieuse, surtout en cas de monocytose associée sur le bilan sanguin.

Plus rarement, des cas atypiques, notamment de localisation oculaire à type de chorioretinite au cours d'une primo-infection ont été rapportés (53,54). Ces différentes manifestations cliniques sont directement en lien avec le génotype de la souche de *T. gondii*. Le génotype de type II (Europe de l'Ouest et Amérique du Nord) est connu pour avoir des conséquences cliniques moindres (55) que d'autres génotypes situés notamment en Amérique du Sud (56,57). Ainsi, des infections oculaires sévères, ont été rapportées au Brésil, en Colombie ou au Canada, où certaines souches ont été décrites comme particulièrement virulentes (58).

Plus rarement encore, des toxoplasmoses disséminées, atteignant les poumons, le système nerveux central ou le cœur ont été rapportées et enregistrées en France au CNR de la toxoplasmose. Le génotype venait pour la plupart d'une souche circulant en Guyane Française (57).

2. *Toxoplasmose de l'immunodéprimé*

Contrairement à la clinique peu bruyante de la primo-infection chez les immunocompétents, l'infection à *T. gondii* chez des patients immunodéprimés est toujours menaçante, que ce soit après une primo-infection ou en cas de réactivation. Les manifestations sont en lien direct avec le statut immunitaire de l'hôte. Les deux terrains sous-jacents principaux à risque de toxoplasmose grave sont l'infection par le VIH et le traitement par molécules immunosuppressives (9).

Ce risque est plus important après la réactivation par rupture d'un kyste déjà présent que lors de l'acquisition *de novo* de la toxoplasmose. Comme déjà vu, chez des patients transplantés d'organe solide, il peut aussi se produire une primo-infection à partir du greffon en cas de mismatch donneur/receveur (59,60).

L'incidence de la maladie est le plus souvent corrélée à la profondeur de l'immunodépression et la présentation clinique est plutôt liée au type d'immunodépression. Par exemple, le risque de toxoplasmose cérébrale est augmenté en cas de lymphocytes CD4 < 100/mm³ chez le patient séropositif pour le VIH, alors que le risque de réactivation est plus fréquent chez les patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (61).

a) Encéphalite

L'encéphalite toxoplasmique est de loin la manifestation clinique principale de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés, notamment les patients atteints du SIDA. Cliniquement, elle se présente sous la forme d'un tableau associant asthénie, céphalées, déficit moteur ou sensitif, atteinte cognitive dans un contexte de fièvre (62). Le diagnostic par scanner et IRM, révèle une image caractéristique d'abcès : lésion arrondie, avec rehaussement périphérique en cocarde après injection de produit de contraste (Figure II-1). Plus rarement, aucune image n'est visualisée (63). Son incidence a fortement diminuée depuis la mise en place des thérapies antirétrovirales (64).

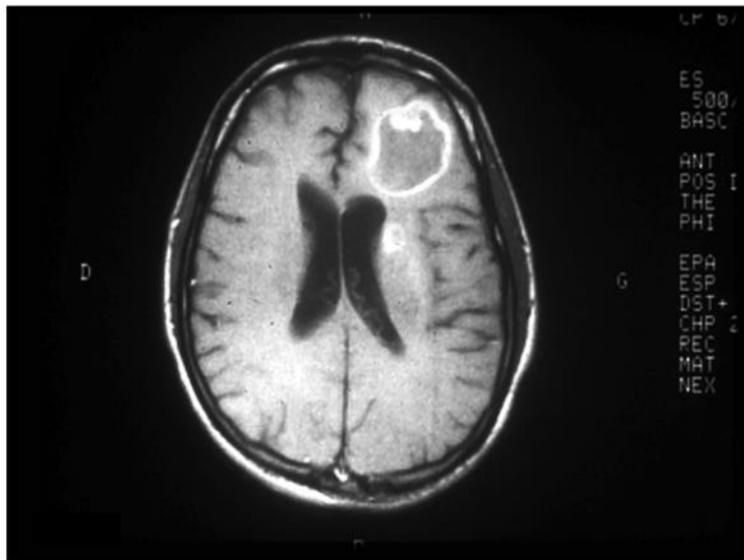


Figure II-1 : Toxoplasmose cérébrale - IRM avec injection (Hôpital Saint Louis, Collection J. Frija)

b) Autres atteintes

En dehors de l'encéphalite, l'infection toxoplasmique chez les immunodéprimés peut toucher un organe isolé ou un ensemble d'organes ; on parlera alors de toxoplasmose disséminée. La toxoplasmose disséminée touchera davantage les patients transplantés, ayant une dissémination du parasite très rapide (60).

Les sites préférentiels sont les yeux (choriorétinite sourde, sans autre signe associé) ; les poumons à l'origine de pneumopathies interstitielles de pronostic très péjoratif ; et le cœur (myocardite) (65). Ils peuvent volontiers s'associer les uns aux autres.

Il a aussi été décrit des atteintes plus rares du foie, du rein, de la rate, du pancréas, de la peau, etc. (66).

3. Toxoplasmose oculaire

Les atteintes oculaires secondaires à une infection toxoplasmique ont pendant longtemps été considérées comme exceptionnelles chez l'immunocompétent, car le plus souvent rattachées aux toxoplasmoses de l'immunodéprimé, et surtout à la toxoplasmose congénitale (24).

Chez l'immunocompétent, il peut s'agir d'infections contemporaines de la contamination, mais elles sont surtout secondaires à une réactivation locale de kystes issus de la primo-infection (67).

Chez les patients immunodéprimés, patients atteints du SIDA la majorité du temps, la fréquence de la localisation oculaire arrive en deuxième place après la localisation cérébrale, qui y est alors souvent associée (68). Les lésions cliniques sont essentiellement de type chorioretinites unifocales ou multifocales, ou bien encore diffuses et/ou bilatérales (Figure II-2). Elles se distinguent des atteintes oculaires des patients immunocompétents par leur extension, leur aspect plus nettement hémorragique (dû à une réaction inflammatoire moins intense) et leur caractère récidivant. L'association à une uvéite, le plus souvent antérieure est courante (69). La toxoplasmose est d'ailleurs la première cause d'uvéite d'origine infectieuse en France, tant chez l'adulte que chez l'enfant (70).



Figure II-2 : Chorioretinite (Université de Lyon, Collection F. Peyron)

En cas de toxoplasmose congénitale, la localisation oculaire est l'une des plus fréquentes. Les caractéristiques principales de cette atteinte congénitale sont développées ci-dessous.

4. Toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale (TC) s'acquiert au cours de la vie fœtale par transmission verticale, dite materno-fœtale. Le placenta jouant un rôle plus efficace de barrière en début de grossesse qu'à la fin, la transmission du parasite est plus fréquente en fin de grossesse qu'en début. Cependant, les conséquences cliniques de la séroconversion toxoplasmique en cours de grossesse sont d'une gravité inversement proportionnelle à l'avancée de celle-ci (71).

Le diagnostic clinique de TC est heureusement très rare en France, le dépistage systématique étant maintenant de rigueur. Cependant, on admet que classiquement, en cas de TC avec présence de signes cliniques, ces derniers regroupent l'atteinte plus ou moins concomitante de chorioretinite (Figure II-2), d'hydrocéphalie (Figure II-3) et de calcifications intracrâniennes. Mais la maladie peut se présenter de façon très

hétérogène, étant capable d'atteindre tous les organes (72). La classification des signes cliniques de la TC faite par Desmonts en 1974, sépare ces manifestations en 4 groupes distincts : l'atteinte neurologique (comprenant l'atteinte oculaire), l'atteinte généralisée, l'atteinte modérée, et l'atteinte infra clinique (49).

Le potentiel évolutif imprévisible de la TC est aussi l'une de ses caractéristiques, d'où la nécessité d'une surveillance régulière et à vie (73).



Figure II-3 : Dilatation ventriculaire en échographie (Université de Lyon, Collection F. Peyron)

a) Au premier trimestre

Au cours du début de grossesse, le risque de passage transplacentaire du parasite est inférieur à 10% (71). Cependant, les conséquences cliniques peuvent être majeures, voire létales dans certains cas. Les atteintes se concentrent au niveau du tissu cérébral ciblant la substance blanche par nécrose focale et inflammation locale sévère. Les manifestations rassemblent microcéphalie, épilepsie, surdité, déficits mentaux ou psychomoteurs, pouvant aller jusqu'à la mort fœtale in utero dans certains cas (74). L'atteinte ophtalmique est elle aussi plus sévère, alliant microphthalmie, inflammation sévère du nerf optique, strabisme, nécrose rétinienne, avec parfois comme conséquence une perte totale de la vue en cas d'atteinte de la macula (67).

b) Au deuxième trimestre

Avec 30% de risque de passage transplacentaire du parasite (71), les manifestations cliniques de toxoplasmose congénitale sont de sévérité variable : épilepsie, anémie, anomalies hépatiques, pneumonie ou encore chorioretinite. Elles sont détectées par échographie sur hyperéchogénéicité mésentérique, hépatosplénomégalie ou calcifications intracérébrales. Plusieurs études ont pu évaluer qu'entre 20 et 30% des lésions intracrâniennes détectées à la naissance évoluent en atteintes neurologiques graves, pouvant aller jusqu'au décès de l'enfant (75,76).

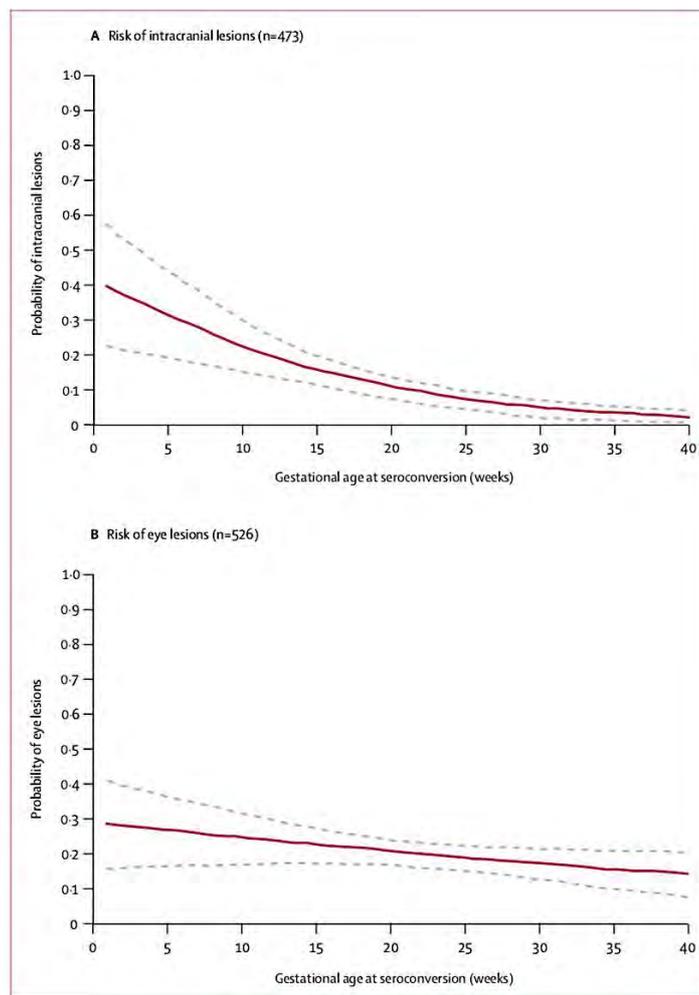
La chorioretinite (Figure II-2) est l'une des manifestations les plus courantes de la toxoplasmose congénitale. Elle peut se manifester à tout moment de la vie de l'enfant (77), raison pour laquelle il existe une surveillance régulière du nouveau-né durant la première année puis durant toute sa vie. En présence d'un traitement postnatal, la sévérité des lésions reste cependant variable notamment selon le génotype de la souche isolée. Par exemple, les nouveau-nés atteints de toxoplasmoses congénitales au Brésil

ont plus de risque de développer des manifestations cliniques oculaires, plus sévères que les enfants atteints de toxoplasmose congénitale en Europe (78).

c) Au troisième trimestre

Il existe un risque de passage transplacentaire d'environ 60-70% au cours du troisième trimestre de grossesse, et ce risque augmente à mesure que l'on s'approche du terme de la grossesse (71). Cependant ce risque est à mettre en parallèle avec la présence de séquelles. En effet, seulement 20% des enfants infectés présenteront des manifestations cliniques, habituellement moins prononcées que celles du premier ou du deuxième trimestre (79)

Dans une méta-analyse de 2007 (80), il a clairement été montré un lien entre la diminution des lésions intracrâniennes à mesure que l'âge gestationnel était tardif lors de la séroconversion. Au contraire, dans le cas des manifestations oculaires de type chorioretinites, ce lien n'a pas été mis en évidence (Figure II-4).



**Figure II-4 - Risque de manifestations cliniques chez les enfants atteints de toxoplasmose congénitale en fonction de l'âge gestationnel au moment de la séroconversion (81)
Lésions intracrâniennes en haut et lésions oculaires en bas.**

d) Cas particuliers

La plupart des toxoplasmoses congénitales sont le résultat d'une infection *de novo*, dite primo-infection d'une femme séronégative en début de grossesse.

Toutefois, il existe de rares cas d'infections congénitales secondaires à une réinfection par le parasite, le plus souvent par une souche de génotype différent, pour laquelle la femme n'est pas encore immunisée, et qui est d'ailleurs le plus souvent plus agressive. C'est la raison pour laquelle les populations « à risque » doivent respecter les règles de prévention, notamment les femmes voyageant dans des pays présentant des souches atypiques, les femmes séropositives au VIH, etc. (82).

Il existe de rares cas de toxoplasmose congénitale secondaire à une primo-infection maternelle survenue dans les 2 mois précédant la conception. Le plus souvent, c'était en lien avec un système immunitaire maternel pathologique.

Pour finir, certaines transmissions de parasites peuvent être « retardées ». En effet, des nouveau-nés de mère ayant eu une séroconversion en période péri-conceptionnelle ont déjà été diagnostiqués positifs en toxoplasmose congénitale en post partum, alors même que les prélèvements de liquide amniotique et les imageries restaient négatifs au cours de la grossesse. Cela suggère deux hypothèses : des performances diagnostiques des tests prénataux moindres que ceux néonataux (83), ou une possible « séquestration » du parasite au sein du placenta avant sa transmission fœtale en fin de grossesse (84).

C. Epidémiologie

Environ un tiers de la population mondiale est infectée par *T. gondii* (1). Les habitudes alimentaires, le niveau socio-économique et le climat influencent le mode de contamination ainsi que la séroprévalence de la toxoplasmose. La prévalence est très faible dans les régions chaudes et sèches (Sahel), faible en Amérique du Nord et en Europe du Nord et Asie, et très élevée dans les régions chaudes et humides (85).

Dans une étude européenne portant sur la recherche des facteurs de risque de séroconversion pour la toxoplasmose au cours de la grossesse, entre 6 et 17% des infections toxoplasmiques sont dues à la consommation des végétaux et fruits en contact avec le sol, et entre 30 et 63% par la consommation de viandes insuffisamment cuites (47).

En France, le Centre National de Référence de la toxoplasmose recense chaque année, les données épidémiologiques en rapport à la fois avec la toxoplasmose de l'adulte, mais aussi la toxoplasmose congénitale et les autres informations s'y rapportant (politique d'évaluation, de dépistage, de diagnostic etc.). C'est ainsi que l'on sait que la prévalence de la toxoplasmose est en nette diminution depuis les années 1960. Elle est estimée aujourd'hui entre 30 et 50% selon les habitudes alimentaires régionales. Chez les femmes enceintes, elle est passée de 84 % en 1960 à 37 % en 2010 ; la dernière enquête nationale périnatale (ENP) a confirmé une prévalence moyenne de 31,3% en 2017 et a prévu une prévalence de 26,9% en 2020. .

Depuis 2006, un réseau de surveillance des toxoplasmoses congénitales (réseau Toxosurv) a été créé à l'initiative de l'InVS et du Pôle Epidémiologique du CNR. Il a été créé afin d'évaluer l'impact du programme national de prévention de la toxoplasmose congénitale mis en place en 1978. Il se base sur les notifications des cas de toxoplasmoses congénitales diagnostiquées sur le territoire national par les laboratoires du réseau Toxosurv (36 laboratoires spécialisés dont Nantes fait partie, et 13 laboratoires polyvalents). On peut évaluer ainsi la prévalence globale de la TC autour de 2 à 3,2 cas pour 10 000 naissances, ce qui est très stable depuis 10 ans. Cela correspond à environ 250 cas de toxoplasmose congénitale notifiés chaque année au CNR. La létalité liée à la TC est de 2,6% et sa morbidité globale représente 8,6%, chiffres restant eux aussi très stables.

Devant la diminution du nombre de toxoplasmoses congénitales ces dernières années, la baisse de la séroprévalence chez les femmes en âge de procréer, et la diminution de l'incidence de la toxoplasmose chez ces femmes, un projet de réévaluation du programme de dépistage de la toxoplasmose congénitale est en cours de rédaction. Celui-ci est appuyé par les données d'efficacité obtenues par l'essai thérapeutique randomisé (PHRC National, Toxogest) et par le CNGOF (Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français), et a pour but d'éviter le surcoût éventuel des dépenses en lien avec le contrôle sérologique mensuel des femmes enceintes séronégatives. L'avis très récent du CNGOF maintient toutefois l'intérêt d'un programme de prévention de la toxoplasmose chez la femme enceinte (86).

D. Méthodes de diagnostic biologique

1. Généralités

Plusieurs techniques diagnostiques existent pour mettre en évidence une infection par *T. gondii*. Celles-ci peuvent être séparées en deux types :

- Les techniques de diagnostic indirect sont à ce jour les plus répandues, et utilisées en routine au laboratoire. Le but de celles-ci est de mettre en évidence la réponse immunitaire en lien avec l'infection, par l'intermédiaire de la présence ou de l'absence d'anticorps spécifiques.
- Les techniques de diagnostic direct visent à mettre en évidence le parasite lui-même, ses antigènes ou son matériel génétique.

Il est indispensable de mettre en parallèle le statut immunitaire de chaque patient pour évaluer l'apport diagnostique de chacune de ces techniques.

Nous allons dans cette partie nous focaliser sur l'ensemble de ces 2 groupes, en prenant pour référence principale une revue bibliographique de 2015, écrite par Liu (87).

2. Diagnostic indirect

Toutes ces méthodes diagnostiques reposent sur un diagnostic dit sérologique. Cela signifie que l'on travaille à partir du sérum du patient suspect de toxoplasmose pour rechercher les anticorps spécifiques de cette infection. Différents tests, développés ci-après, ont été créés pour rechercher certains types d'anticorps préférentiellement. La

plupart du temps, une association de ces tests est nécessaire afin de bien dater l'infection en cours (88).

Ces méthodes gardent une place centrale dans l'arsenal diagnostique de la toxoplasmose et leurs indications sont larges. Elles ont toutes pour but de déterminer le statut immunitaire des patients : les femmes enceintes, les patients présentant une uvéite ou une chorioretinite, ou les patients donneurs et receveurs d'organes. Aussi, elles sont utiles pour éliminer des diagnostics différentiels d'une suspicion clinique de séroconversion toxoplasmique, tels que les primo-infections CMV, VIH ou EBV. En cas de positivité de ces tests, une étude plus approfondie de la réponse immunitaire (tests dits complémentaires, analyse de sérums successifs) permet également de dater l'infection.

Le diagnostic indirect repose donc sur l'étude des acteurs de la réaction immunitaire de l'hôte après infection par *T. gondii*. Pour interpréter correctement les résultats de chacun des tests, une connaissance parfaite de la réaction immunitaire « normale » d'un hôte immunocompétent est requise.

a) Cinétique et détection des anticorps

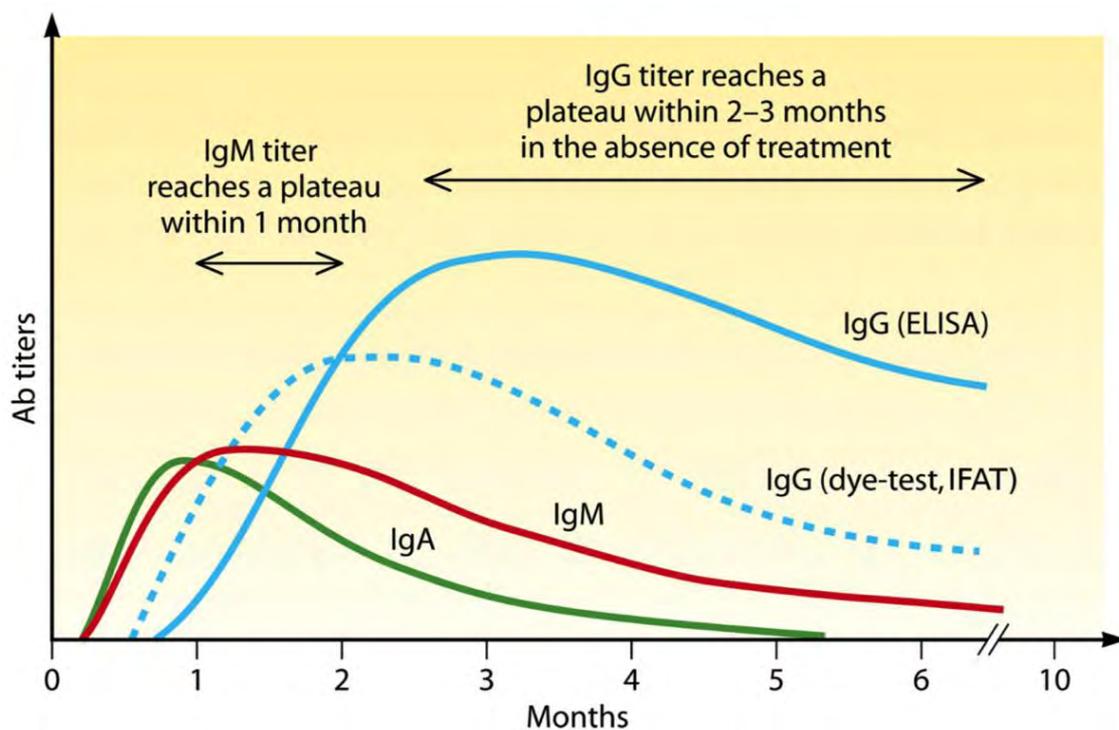


Figure II-5 : Cinétique des anticorps (9)

Comme visualisé sur la Figure II-5, différents isotopes d'immunoglobulines (IgM, IgA et IgG) sont produits à la suite d'une infection par *T. gondii* (9,88).

- Les IgM sont synthétisés et détectables dans le sérum environ une semaine après l'infection. Ils atteignent un plateau autour de 1 mois pour rester présents pendant quelques mois (en moyenne 6-7 mois) voire plusieurs années pour certains cas. Ils peuvent cependant exceptionnellement ne persister que 3 mois,

voire ne pas être détectables par les techniques usuelles, rendant donc des résultats faussement négatifs. Les techniques utilisées, bien que peu spécifiques, sont essentiellement les tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) l'IFA (Immunofluorescent Assay) et ISAGA (Immuno-Sorbent Agglutination Assay). Du fait de leur persistance à distance de la primo-infection, et du manque de spécificité des techniques de révélation, les IgM ne peuvent pas être déterminants pour diagnostiquer une infection aiguë.

- Tout comme les IgM, les IgA sont synthétisés et détectables dès la phase aiguë, environ une semaine après l'infection. Ils restent cependant présents pendant une période plus longue, en moyenne 9 mois, les rendant moins spécifiques que les IgM en tant que marqueur d'infection récente (89). Néanmoins, grâce à des techniques extrêmement sensibles, ils se sont révélés être un outil indispensable au diagnostic de toxoplasmose congénitale chez le fœtus et le nouveau-né, alors même que les IgM restent négatifs (90). De même ils sont d'une grande utilité dans le cadre des diagnostics de réactivation, ayant alors de taux très hauts. Leur mise en évidence repose essentiellement sur les tests ELISA et ISAGA.
- Les IgG sont les témoins d'une infection, actuelle ou passée, et ne donnent ainsi aucune information sur l'ancienneté de celle-ci. Surtout, leur détection dépend des techniques utilisées. Celles utilisant les antigènes de membrane (IF, agglutination modifiée) ou le parasite entier (Dye test) ont une capacité de détection très bonne et précoce, mais celle-ci devient plus médiocre et plus tardive pour les techniques de type ELISA, ou au cours du test d'avidité. Ils apparaissent environ 1 à 3 semaines après les IgM, restant en plateau pendant 2-3 mois pour diminuer plus ou moins rapidement. Ils restent toujours détectables à des taux très différents d'un patient à l'autre, et d'une technique à l'autre.
- Les IgE (non présents sur cette figure) sont détectables par la méthode ELISA. Ils sont un bon reflet d'une infection de l'adulte en cours, ou d'une toxoplasmose congénitale avec ou sans chorioretinite. Ils apparaissent durant une période très brève, et sont donc témoin d'une infection récemment contractée. Ces anticorps ne sont cependant pas recherchés en routine.

Dans le cadre des séroconversions en cours de grossesse, il est important de savoir que contrairement aux IgG, qui passent la barrière placentaire, les anticorps de type IgM et IgA ne peuvent traverser cette dernière.

b) Dye test : test de lyse des toxoplasmes vivants

Cette méthode, mise au point par Sabin et Feldman en 1948 est aujourd'hui encore considérée comme le gold standard dans le diagnostic sérologique de la toxoplasmose (91). Elle nécessite cependant une expertise technique élevée (maintien des toxoplasmes vivants).

Le principe repose sur la mise en contact du sérum du patient avec des tachyzoïtes vivants de *T. gondii* et leur observation au microscope classique, après addition de bleu de méthylène, ou en contraste de phase. En cas de présence d'anticorps anti-toxoplasme,

la lyse des toxoplasmes vivants par les anticorps anti *T. gondii* est visualisée en présence de complément humain frais. Les toxoplasmes perdent alors leur réfringence.

Ce test reste un test de référence bien qu'onéreux et non automatisable. Il est extrêmement sensible, spécifique et permet donc une réponse rapide, en détectant l'infection entre 10 et 15 jours post contamination.

c) Test d'agglutination directe

Ce test a été décrit pour la première fois par Fulton et Turk en 1959 (92). Ici, des tachyzoïtes sont fixés par formol et sont ajoutés dans des puits puis mis en présence du sérum à analyser plus ou moins dilué. En cas de positivité, il se produit une agglutination en voile, contrairement à une réaction négative qui montre un point central et compact de tachyzoïtes regroupés dans le fond du puits (Figure II-6).



Figure II-6 : Exemple d'interprétation d'un test d'agglutination négatif (à gauche), positif (au centre) et douteux (à droite) (Banque d'image Getty)

Cette méthode initiale a été améliorée par l'ajout systématique de 2-mercaptoéthanol afin d'éliminer les IgM de surface non spécifiques de *T. gondii*.

Pour sensibiliser la détection des IgG au stade aigu de l'infection, la préparation des antigènes peut être faite avec de l'acétone et non du formol. Il s'agit d'une technique utilisée dans certains cas d'interprétation difficile (notamment chez les patients immunodéprimés etc.) (87). Par comparaison avec les antigènes traités par formol, ce test d'agglutination dite alors « différentielle » permet de distinguer infection aiguë et infection chronique, à confirmer cependant avec d'autres techniques (88).

Cette méthode est encore très utilisée actuellement (coffret ToxoScreen DA de chez Biomérieux) mais sa production est destinée à disparaître.

d) Test ISAGA : Immuno-Sorbent Agglutination Assay

Proposé par Desmont en 1981, cette réaction repose sur le principe d'immuno-capture des anticorps, et l'utilisation de toxoplasmes formolés.

Ce test nécessite des plaques de micro-titrations avec des puits recouverts d'anticorps anti IgM (ou IgA) de type anti-globuline anti chaîne μ (ou α), servant à « capter » les

anticorps d'intérêt. Dans ces puits sont rajoutés les sérums (humains) à analyser qui se lieront, ou non, aux anticorps anti IgM (ou IgA) selon la présence ou l'absence d'IgM (ou IgA) sériques. Au décours d'un lavage et pendant une incubation d'une nuit, une suspension de tachyzoïtes entiers formolés est ajoutée. Ces tachyzoïtes se lieront aux anticorps IgM ou IgA sériques spécifiques s'ils sont présents. La lecture est visuelle. (Figure II-7)

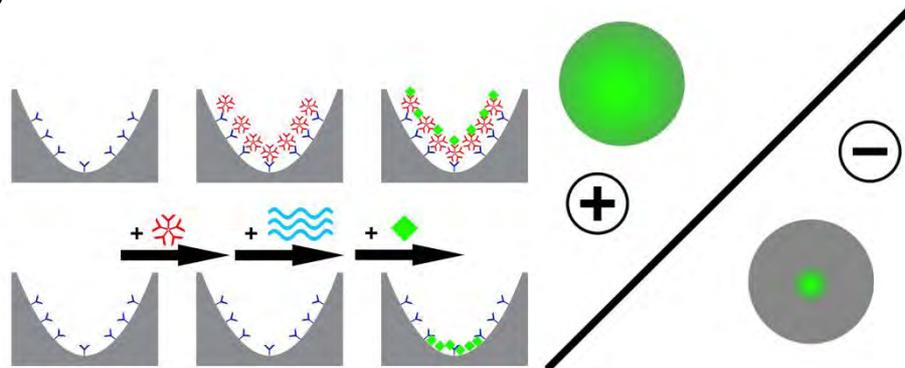


Figure II-7 : Illustration de la technique ISAGA (Wikipédia)

Ce test possède l'avantage d'être facile à réaliser, bien que restant une technique manuelle. Mais le nombre de tachyzoïtes nécessaires l'a rendu plus difficile d'accès. L'utilisation non plus de tachyzoïtes, mais de particules de latex coatées avec des antigènes solubles, a permis sa simplification (93).

Il s'agit de la méthode la plus sensible pour détecter les anticorps IgM, car elle évite les phénomènes de compétition IgG et IgM, et est moins sensible aux interférences dues au facteur rhumatoïde et aux anticorps anti nucléaires.

Elle est actuellement essentiellement utilisée dans le cadre du diagnostic de toxoplasmose congénitale en période néonatale et en cas de suspicion de début de séroconversion. Elle sert dans ces deux indications à confirmer la présence d'IgM par une technique différente de la première utilisée (94).

e) Test d'immunofluorescence indirecte (IFI)

Dans ce test, des tachyzoïtes de *T. gondii* tués (ou des antigènes de *T. gondii*) sont fixés sur une lame puis incubés avec le sérum à analyser. Après ajout d'anticorps fluorescent anti humain (anti-globuline anti IgG ou anti IgM) marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (fluorophore), la lame est lue au microscope à fluorescence (Figure II-8).

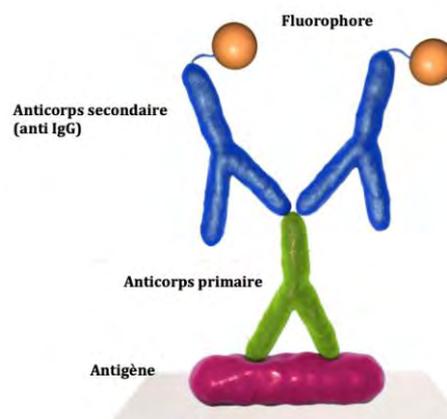


Figure II-8 : Test d'immunofluorescence indirecte (Banque d'image Getty)

Cette méthode, bien que peu chère et pouvant mettre en évidence à la fois les anticorps IgG et IgM (95) nécessite la présence d'un microscope à fluorescence. Elle reste un examen opérateur dépendant, car avec lecture visuelle du résultat (96). Aussi, il existe des réactions croisées avec le facteur rhumatoïde ou les anticorps anti-nucléaires, aboutissant à des résultats faussement positifs. Ces raisons expliquent qu'il ne s'agit donc plus à l'heure actuelle d'une méthode diagnostique utilisée en pratique de routine en laboratoire. Elle reste cependant pratiquée dans les centres experts dans des indications particulières.

f) Test ELISA

Cette technique (Figure II-9) répond à l'ensemble des tests de type immuno-enzymatiques, ELISA signifiant Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Leur principe général est la mise en contact d'une « phase » dite solide (anticorps ou antigène) avec un antigène ou un anticorps marqué par une enzyme, puis avec le substrat de cette enzyme. Chacun de ces acteurs pouvant être changé pour détecter antigène et / ou anticorps selon son besoin.

Il existe plusieurs types d'ELISA. Les deux principaux sont développés ci-dessous.

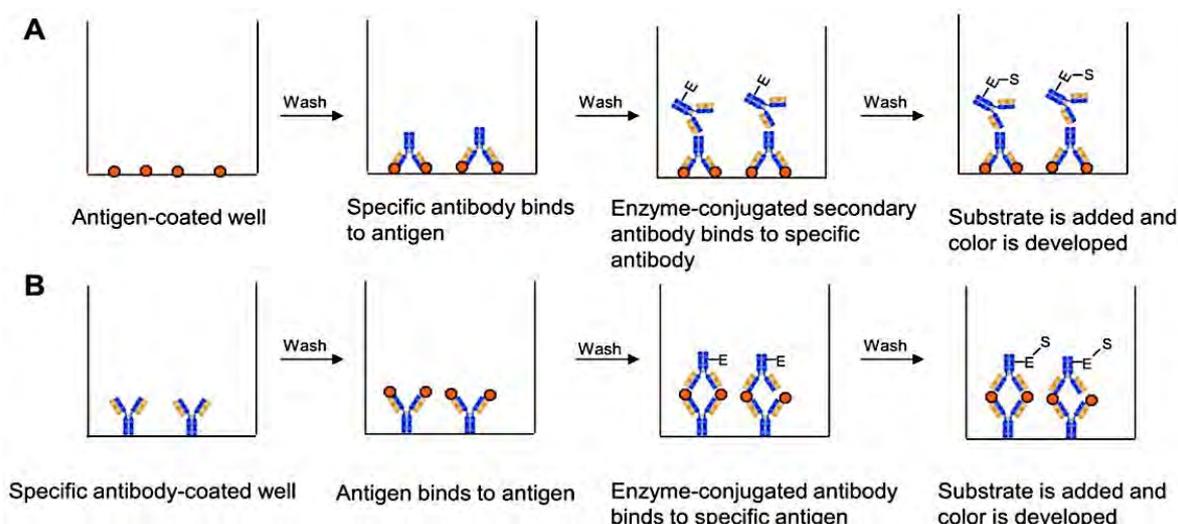


Figure II-9 : Principes des tests ELISA indirects (A) et en sandwich (B) (87)

(1) Test ELISA indirect

Ici, la phase dite solide est l'antigène d'intérêt, auquel on ajoute successivement l'échantillon sérique du patient (contenant possiblement les anticorps d'intérêt, dit A) puis un second anticorps (appelé B) ciblant le premier anticorps A d'intérêt (Figure II-9 A) et lié à une enzyme. Après ajout du substrat enzymatique, l'intensité de coloration sera proportionnelle à la quantité d'anticorps d'intérêt sérique A. Elle sera lue le plus souvent par densitométrie optique, technique de chimiluminescence, à l'aide d'une courbe d'étalonnage faite au cours du test.

On peut rechercher avec ces tests à la fois les IgG, les IgM ou les IgA anti *T. gondii*, selon l'anticorps secondaire utilisé (97). Les antigènes utilisés étaient auparavant un lysat d'antigène de tachyzoïtes mais les résultats n'étaient que peu reproductibles. Secondairement et actuellement, les antigènes utilisés regroupent des antigènes

granulaires, des protéines du micronème, ou encore des antigènes de surface. Ils peuvent être associés pour améliorer la sensibilité et la spécificité de la technique, en fonction de l'intérêt diagnostique recherché (recherche d'IgG post infection récente, recherche d'IgM ou d'IgA) (32,98).

(2) Place des tests ELISA et interprétation

Ces tests ELISA sont simples, efficaces, économiques et utilisables facilement en pratique clinique. Ils peuvent détecter à la fois des anticorps IgM, IgG ou IgA, mais aussi des antigènes circulants en cas d'ELISA type « sandwich ». Leur utilisation en pratique courante est devenue incontournable, si bien qu'elle s'est développée et est actuellement automatisée afin de traiter de nombreux échantillons en même temps pour le travail de routine.

Il est important de savoir que les valeurs seuils de ces tests sont spécifiques à chaque kit, rendant impossible l'interprétation de la cinétique des taux d'anticorps entre deux kits différents. Effectivement, même si deux kits différents peuvent utiliser la même technique, les résultats ne sont pas comparables car les antigènes utilisés sont différents. Les titres d'anticorps détectés par cette technique peuvent être très variables d'une technique et d'un kit commercial à l'autre. La comparaison de deux sérums nécessite donc obligatoirement qu'ils soient testés avec la même méthode et dans la même série (94).

De même, l'interprétation peut être difficile en cas de niveau faible d'IgG par exemple. Dans ce contexte, une deuxième technique, cette fois ci très spécifique, doit y être ajoutée, de type Western Blot ou Dye test.

Les titres d'anticorps, notamment IgG peuvent servir à dater une infection, par rapport à leur cinétique. La plupart du temps, en cas d'infection datant de moins de 2 mois, un second sérum prélevé à 2-3 semaines du premier, en absence de traitement (99) montre des taux d'IgG ayant doublé.

g) Test d'avidité

Devant des tests permettant de détecter des faibles taux d'IgM et manquant de spécificité, la datation de l'infection demeure difficile. Le test d'avidité est utilisé pour justement pallier à ce problème. En effet, en cas d'infection avérée, les anticorps IgG anti *T. gondii* reviennent positifs en sérologie. Cependant, en absence de résultats antérieurs, on ne peut évaluer l'ancienneté de cette infection. Les IgM et les IgA ne permettent pas de « dater » l'infection aiguë précisément, du fait par exemple de leur persistance à des titres parfois toujours élevés près de 2 ans après l'infection (100–102).

Le test d'avidité a été décrit par Hedman et al. en 1989. Son principe repose sur la notion que la liaison d'un anticorps à son antigène est d'autant plus « forte » que l'infection est ancienne. Cette force de liaison est testée en utilisant un agent dénaturant la liaison antigène-anticorps au cours des lavages. En pratique, l'urée est largement utilisée, mais il existe aussi d'autres agents dénaturant (103).

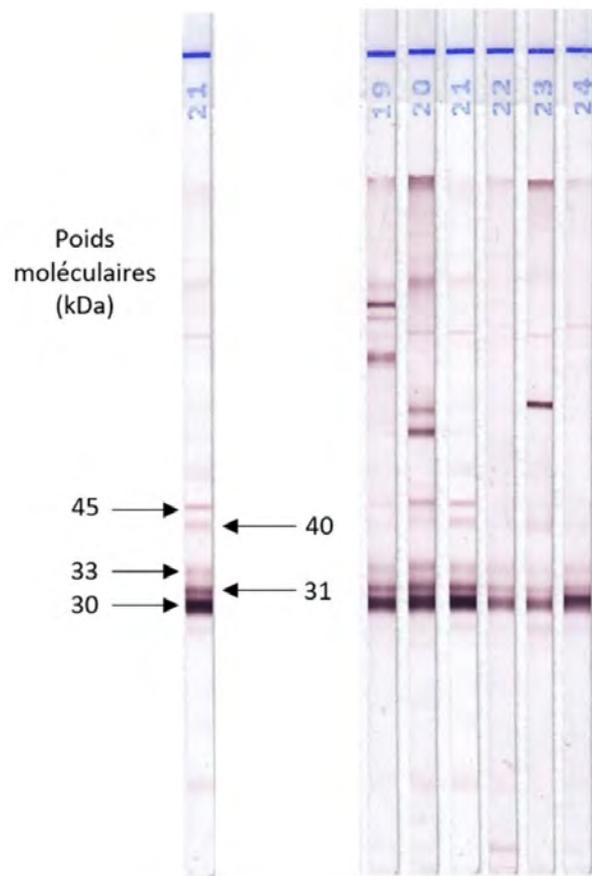
Ce test est maintenant largement utilisé dans la pratique courante pour différencier les infections chroniques des infections aiguës à *T. gondii*, notamment en cas de détection d'IgM en cours de grossesse, ou encore pour des sujets symptomatiques. On utilise la

différence de titres calculés en absence et en présence d'agent dénaturant après test ELISA, en le convertissant sous forme d'un rapport. En cas de différence faible, l'avidité est donc forte, et l'infection peut être considérée comme ancienne. Cependant, dans le cas contraire où il existe une différence majeure avant et après traitement, nous ne pouvons pas conclure à une infection récente (104).

Son interprétation peut être difficile, notamment dans le cadre du diagnostic biologique de toxoplasmose congénitale. En effet, il a été rapporté la présence d'anticorps IgG de faible avidité pouvant persister pendant des mois (105) et le traitement de la toxoplasmose congénitale (par spiramycine par exemple) peut retarder la maturation de l'avidité des IgG anti *T. gondii* (99). De plus, la concentration en anticorps dans l'échantillon peut affecter les résultats (106) rendant ce test non utilisable chez les immunodéprimés.

h) Immuno Blot de confirmation

Contrairement aux techniques ci-dessus, les tests d'Immunoblot, préférentiellement les Western Blot, sont davantage utilisés comme aide complémentaire au diagnostic sérologique dans certaines indications plus précises ; il s'agit d'un test de confirmation purement qualitatif.



**Figure II-10 : Immunoblot de confirmation :
témoin positif (bandelette n°21) et bandelettes patients (n° 19, 20, 22, 23, 24)
(notice du kit IgG II confirm LD Bio)**

Ici, les sérums d'intérêt réagissent avec des antigènes de *T. gondii* qui ont été transférés sur une membrane de polyacrylamide. Plusieurs antigènes y sont fixés, avec des poids moléculaires différents, et la révélation des complexes antigène-anticorps, permet de mettre en évidence des combinaisons d'anticorps sériques (Figure II-10) correspondant à des situations cliniques différentes (107).

Grâce à leur grande sensibilité et spécificité, ils permettent de confirmer la présence d'IgG spécifiques de *T. gondii*, lorsque l'on a déjà mis en évidence la présence de ces anticorps à titre faible par technique ELISA, ou bien dans certaines situations cliniques délicates (108).

i) Profil immunologique comparé

Le principe général de cette technique est de comparer la présence ou l'absence des anticorps IgM, IgG ou IgA dans deux compartiments différents de l'hôte. Il existe 2 cas d'applications :

- Cas de la toxoplasmose oculaire

On compare ici la présence d'IgG et/ou d'IgA dans le sérum du patient et dans son humeur aqueuse ou son vitré en cas de suspicion de toxoplasmose oculaire. La présence d'une ou de plusieurs bandes supplémentaires sur le profil de l'humeur aqueuse ou du

vitré, par rapport au profil du sérum, signe la synthèse locale d'anticorps et donc la présence d'une toxoplasmose oculaire.

- Cas de la toxoplasmose congénitale

Dans le cas de suspicion de toxoplasmose congénitale, la comparaison se fait entre le sérum maternel prélevé à l'accouchement et le sérum du nouveau-né. Les profils comparés portent à la fois sur les IgM et sur les IgG.

Les règles plus précises d'interprétation de cette technique sont décrites dans la suite de ce travail.

Il est à noter que pour cette technique de profil comparé, il est nécessaire de posséder une quantité minimale de sérum du nouveau-né ou d'humeur aqueuse, ce qui peut être limitant. Ainsi les profils comparés peuvent parfois manquer en cas de quantité insuffisante de sérum ou d'humeur aqueuse.

j) Autres

(1) Test d'agglutination sur particules de latex

Dans ce test, les antigènes solubles sont coatés sur des particules de latex qui s'agglutinent entre elles via les potentiels anticorps IgG anti *T. gondii*. Ses performances diagnostiques chez l'Homme en font l'un des tests privilégiés pour les études de dépistage. Cependant comme tout test de dépistage, celui-ci doit être confirmé par un autre test, utilisant une autre technique disposant d'une grande spécificité.

(2) Test d'hémagglutination indirecte

Son principe repose sur la mise en contact de globules rouges, précédemment sensibilisés avec un antigène soluble de *T. gondii*, avec des potentiels anticorps spécifiques contenus dans le sérum du patient. En cas de présence de ces anticorps, on observe une hémagglutination. Le risque est d'avoir de faux négatifs en cas d'infection récente car la détection des anticorps IgG par cette technique est plus tardive qu'avec celle du Dye Test, ce qui le rend moins utilisée que les précédentes (109).

Ce test est toutefois utilisé couramment pour les études épidémiologiques et comme test de dépistage, car il reste simple et rapide

(3) Test immunochromatographique

Le test immunochromatographique (Figure II-11) est un test rapide de détection faisant intervenir la migration de l'échantillon analysé sur une membrane de cellulose sur laquelle est fixé un antigène de *T. gondii* (bande test). Le traceur utilisé est un antigène marqué. Une fois l'échantillon déposé, les éventuels anticorps spécifiques vont se lier à l'antigène marqué. Après migration le complexe anticorps-antigène est capturé par l'antigène au niveau de la bande test, détectable par une réaction de couleur (110).

Cette technique possède de très bonnes performances diagnostiques et l'avantage d'être rapide, simple, sans équipement spécifique nécessaire. Cependant, ce test est unitaire et détecte de façon concomitante la présence IgG et IgM, sans distinguer l'un de l'autre. Sa lecture est visuelle. Il est ainsi souvent utilisé en confirmation d'une technique de screening.

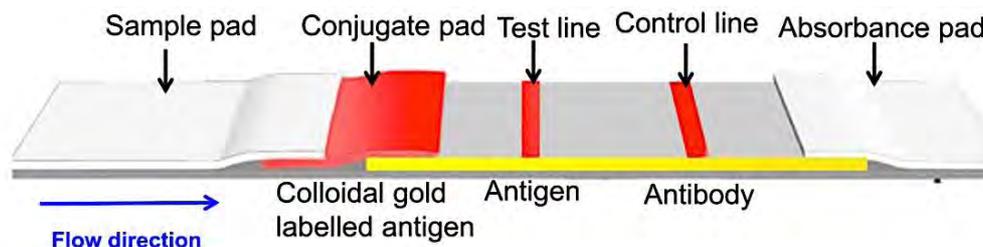


Figure II-11 : Principe du test immunochromatographique (87)

3. Diagnostic direct

a) Généralités

Le diagnostic direct repose sur la mise en évidence de l'agent causal lui-même, par différents moyens. Celui qui supplante actuellement ce diagnostic est la technique de biologie moléculaire. En effet, la plupart des diagnostics d'infections toxoplasmiques peuvent être faits à partir des techniques conventionnelles développées ci-dessus. Mais dans certains cas, notamment chez les patients immunodéprimés (où la sérologie n'est pas interprétable) ou en cas de suspicion de toxoplasmose congénitale chez une femme enceinte ayant fait une séroconversion récente, ces techniques de diagnostic indirect se voient limitées.

Avant de s'attarder sur cette technique, il est indispensable de parler du diagnostic microscopique et de l'inoculation à la souris. Ces deux méthodes sont restées longtemps les seules présentes dans cette catégorie. Elles sont maintenant très peu utilisées en routine du fait de leur long temps de préparation et de leur faible sensibilité.

b) Diagnostic microscopique

Cette technique repose sur la recherche au microscope optique de formes parasitaires connues de *T. gondii* : les tachyzoïtes voire les kystes tissulaires, le plus souvent après coloration au May-Grunwald Giemsa (MGG). La microscopie électronique n'est pas utilisée en routine.

Il s'agit d'une technique peu sensible et peu fiable. Pour pallier à ce manque de sensibilité, la centrifugation ou la filtration des échantillons est recommandée pour concentrer l'échantillon, ainsi que la coloration des kystes tissulaires, par la coloration au Giemsa et Hématoxyline Eosine (HE) ou par la coloration « Periodic Acid Schiff » (PAS) qui marque les granules d'amylopectine des bradyzoïtes.

Le temps de lecture important ainsi que sa faible sensibilité par rapport à des techniques telles que la PCR a rendu la recherche microscopique du parasite désuète, et peu pratiquée au quotidien.

c) Inoculation à la souris

Les essais biologiques sur des animaux sont généralement considérés comme le gold standard en matière de validation diagnostique d'une infection par *T. gondii*. L'étude peut se faire à partir de prélèvements d'origines multiples (liquide amniotique, placenta,

LCR, sang, biopsies, etc.) pour tenter d'isoler le parasite. Les animaux utilisés sont habituellement les souris (111).

Les limites essentielles de cette technique résident dans la mise en place de la technique (présence d'une animalerie, agrément vétérinaire pour travail sur des êtres vivants), le temps nécessaire avant d'aboutir à un résultat (autour de 4-6 semaines) ainsi que la nécessité d'avoir un parasite encore viable dans les échantillons traités. Il est bien évident que d'un point de vue éthique, cette technique est fortement discutable, alors même que d'autres techniques, telle que la PCR sont arrivées, avec une sensibilité supérieure.

Son grand avantage est sa capacité à isoler la souche et secondairement la conserver, pour la typer à la fois pour une visée épidémiologique et pour une optimisation de la prise en charge du patient infecté (notamment en cas de souches hypervirulentes) (74).

Nous reviendrons sur la pratique de cette technique plus en profondeur dans la deuxième partie de ce travail.

d) Amplification de l'ADN

(1) PCR

La technique de PCR signifie « Polymerase Chain Reaction » en anglais. Il s'agit d'une méthode d'amplification enzymatique (à l'aide d'une ADN polymérase, la Taq polymérase) *in vitro* d'un matériel génétique spécifique choisi, à partir d'une quantité minimale d'ADN de départ (112).

La première PCR mise au point pour la recherche de *T. gondii* a été établie en 1989 (113) et est largement utilisée pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale (83) et de toxoplasmose chez les sujets immunodéprimés (114,115). Le matériel génétique spécifique de l'espèce *T. gondii* est représenté par deux séquences cibles : le gène B1 et la séquence REP529 qui est la plus sensible à l'heure actuelle. Ce sont ces deux séquences qui seront alors amplifiées (116).

(a) *PCR classique*

La phase finale de la PCR conventionnelle est la détection de l'amplification. Une des techniques utilisées est l'hybridation avec une sonde spécifique afin de vérifier que le produit de PCR est bien celui de la séquence recherchée.

La PCR conventionnelle a rapidement été abandonnée au profit de la PCR en temps réel, qui a permis d'ajouter la possibilité d'une quantification de matériel génétique.

(b) *PCR en temps réel*

La PCR en temps réel, appelée qPCR, possède de nombreux avantages comparativement à la PCR standard. Elle peut en effet détecter de très faibles quantités d'une séquence d'intérêt, comme la PCR classique, mais ici, le produit d'amplification est mesuré à chacun des cycles d'amplification. C'est une technique utilisable dans différents échantillons, dont le sang, le LCR, l'humeur aqueuse ou le liquide amniotique par exemple. Elle peut être utilisée pour évaluer la réponse à un traitement étant donné sa

grande précision, et est devenue dans le cadre de la toxoplasmose congénitale la technique considérée comme la plus performante (87).

Le principe de PCR en temps réel (Figure II-12) est basé sur le couplage à un système de lecture détectant le matériel génétique amplifié, à l'aide d'une sonde Taqman (associant deux fluorochromes, l'un émettant de l'énergie, et l'autre l'absorbant) le plus souvent.

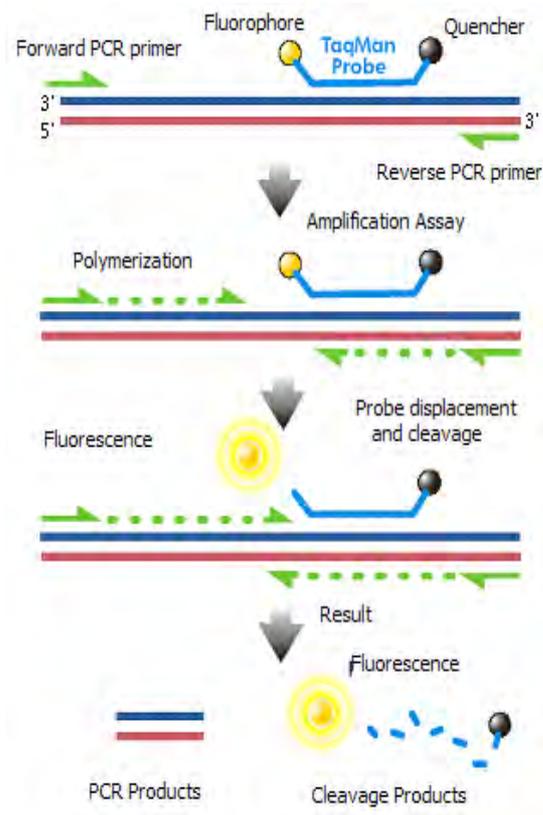


Figure II-12 : Principe de la PCR en temps réel avec sonde TaqMan (118)

Nous reviendrons sur le déroulement de cette technique en pratique quotidienne au laboratoire de Parasitologie du CHU de Nantes dans un second temps.

(2) LAMP

LAMP signifie en anglais « Loop-mediated isothermal amplification ». Il s'agit d'une technique d'amplification isothermique par l'intermédiaire de « boucles ». Son principe repose sur l'amplification d'une séquence nucléotidique choisie spécifique de *T. gondii* grâce à l'utilisation de 4 amorces « primers » entourant celle-ci (117).

Elle utilise les séquences génétiques de protéines SAG1, B1, SAG2 et GRA1 et mais aussi celle du gène REP529. Différents systèmes de détection de l'amplification ont été mis au point. Celui de la détection d'un trouble dans le milieu réactionnel (précipité de pyrophosphate de magnésium) est couramment utilisé.

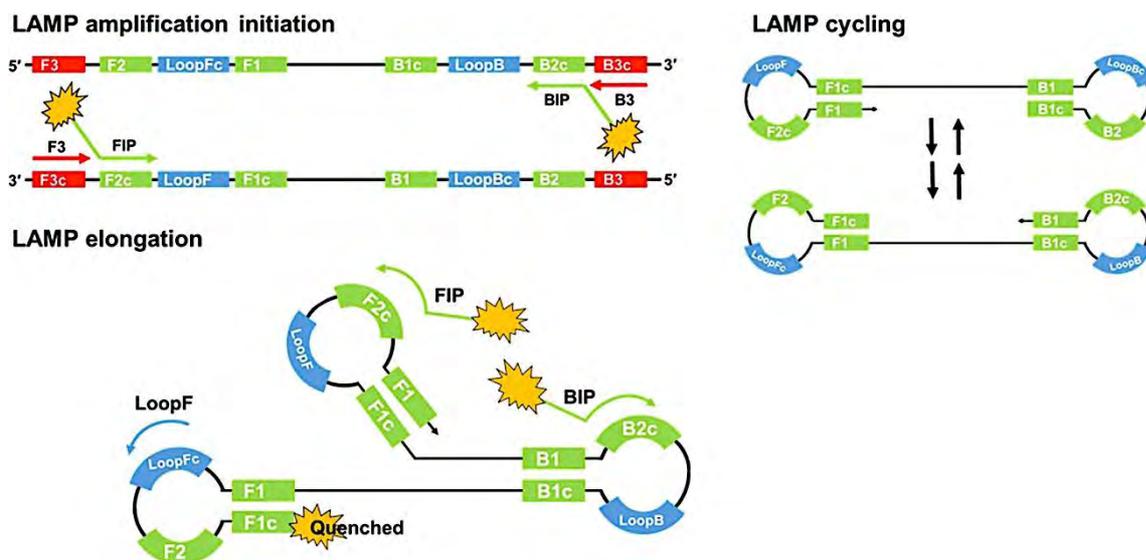


Figure II-13 : Principe de la technique "LAMP" (117)

Cette méthode, bien qu'extrêmement sensible, resterait très légèrement moins sensible que la PCR en temps réel dans une comparaison faite en 2012 (118).

La grande différence avec les autres techniques de biologie moléculaire, est son utilisation en condition isothermique ce qui permet un gain à la fois de temps et de matériel, aspect non négligeable sur le plan financier. Cependant c'est une technique qui est sujette à la contamination, elle requiert donc, tout comme la qPCR, une extrême vigilance de la part des opérateurs (87).

4. Diagnostic non biologique

a) Imagerie

Les techniques d'imagerie font partie des méthodes de diagnostic indirect, mais non sérologiques. Elles sont davantage une aide au diagnostic (mise en évidence d'une anomalie sur signe d'appel clinique) et font partie du bilan d'extension et de la surveillance thérapeutique en cas de lésions identifiées.

Ainsi, les scanners et IRM cérébraux sont largement utilisés dans le cadre des encéphalites et abcès cérébraux des patients immunodéprimés, initialement pour dépister et localiser les lésions, mais aussi pour rechercher lors d'un bilan d'extension. L'échographie est utilisée dans le cadre des suspicions de toxoplasmoses congénitales au stade prénatal, ou en période néonatale pour évaluer une hydrocéphalie ou des calcifications cérébrales par exemple (119,120).

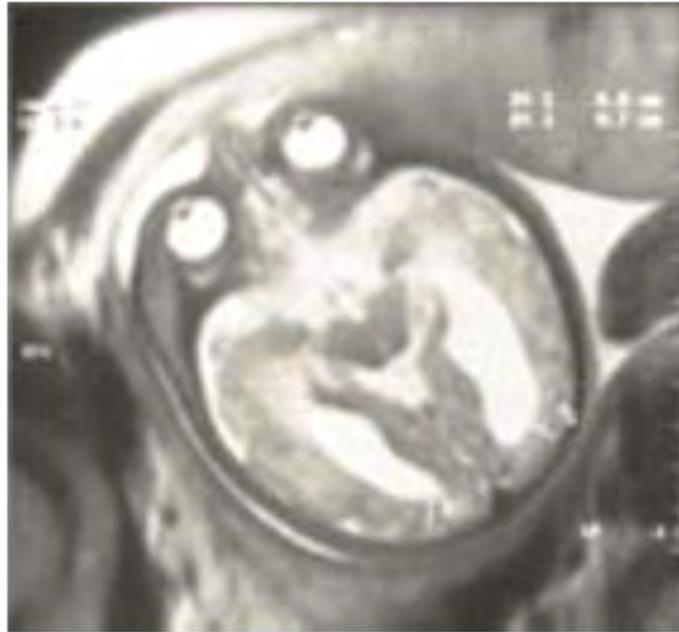


Figure II-14 : Dilatation ventriculaire en IRM T1 (Université de Lyon, Coll. F. Peyron)

b) Fond d'œil

Dans le cadre du diagnostic de toxoplasmose oculaire, le fond d'œil est l'examen de référence (24). Ce test est utilisé à la fois sur le plan diagnostique de la toxoplasmose oculaire mais surtout au niveau de la surveillance dans la prise en charge des toxoplasmoses congénitales. Effectivement le risque de récurrence important, et la possibilité d'atteinte oculaire à distance de la contamination, nécessitent une surveillance accrue et régulière.

Il s'agit d'un examen simple, ne permettant cependant que d'orienter le diagnostic devant des lésions oculaires, étant donné que ces lésions ne sont pas spécifiques de la toxoplasmose (67). Il est ainsi utilisé en première intention en cas de manifestations ophtalmiques en dehors de toute suspicion de toxoplasmose ou en sa présence, et en bilan d'extension en cas de toxoplasmose avérée.

E. *Prise en charge actuelle*

1. Généralités

Les traitements de la toxoplasmose (121) sont représentés de façon générale par deux types d'agents :

- les inhibiteurs de la synthèse d'acide folique dans le cytoplasme :
 - inhibiteurs de la dihydrofolate reductase : la pyriméthamine et le triméthoprime
 - inhibiteurs de la dihydroptéroate synthetase : incluant essentiellement les antibiotiques appelés sulfamides (sulfadiazine, sulfadoxine et sulfaméthoxazole)

- les inhibiteurs de la synthèse protéique, actifs sur l'ARN 23S. Ces inhibiteurs sont essentiellement représentés par les antibiotiques appelés macrolides, dont le chef de file est la spiramycine.

Tous ces traitements sont efficaces contre les tachyzoïtes mais ne sont pas actifs contre les kystes enfermant les bradyzoïtes ; ces derniers pouvant se réactiver en cas d'immunodépression du patient.

Le gold standard actuel associe la pyriméthamine avec un sulfamide : sulfadiazine (PS) ou sulfadoxine. Il existe cependant aussi l'association triméthoprime sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ou bien plus rarement encore l'atovaquone associé à la pyriméthamine, sulfadiazine et acide folinique.

Certaines précautions sont à noter dans l'utilisation de l'association PS. Devant leur effet antagoniste de l'acide folique, ces traitements entraînent une toxicité hématologique notable (majoritairement des neutropénies), raison pour laquelle ils doivent toujours être associés à de l'acide folinique. Il est donc indispensable de surveiller la NFS (compte des éléments figurés du sang) régulièrement, toutes les 1 à 2 semaines. Ils doivent aussi être accompagnés d'une bonne hydratation, avec alcalinisation des urines (122). A noter que ce traitement est contre indiqué chez les patients présentant un déficit en G6PD, devant un risque augmenté d'anémie.

2. Toxoplasmose hors toxoplasmose congénitale

a) Toxoplasmose de l'immunocompétent

La toxoplasmose chez les sujets immunocompétents (hors grossesse) ne nécessite habituellement aucun traitement étant donné que celle-ci est asymptomatique dans la majorité des cas. Il sera cependant à discuter en cas de symptômes persistants ou sévères (123) (fatigue extrême et longue, atteinte oculaire) ou dans certaines régions du monde, comme en Amérique du Sud, où il est retrouvé des souches virulentes de ce parasite entraînant des symptômes plus graves, allant parfois jusqu'au décès du patient (121).

Le traitement classique associera alors spiramycine et acide ascorbique en cas de fatigue persistante, mais il peut être étendu à l'association PS et acide folinique en cas d'atteinte plus sévère avec souche virulente (1,23,121). La durée habituelle du traitement sera de 4 à 6 semaines.

b) Toxoplasmose oculaire

Il n'existe pas de consensus d'experts sur l'attitude thérapeutique à tenir en pratique, d'autant plus que la toxoplasmose oculaire peut dans certains cas guérir spontanément (124). Cependant, il semblerait qu'en cas d'indication de traitement, l'association PS et acide folinique, le cotrimoxazole ou encore les injections intra vitréennes de clindamycine, seraient les traitements à privilégier (121). Les corticoïdes, par voie locale ou générale (125) sembleraient aussi être efficaces si ces derniers sont associés aux traitements antibiotiques. Il est aussi possible de rajouter un traitement préventif

secondaire en cas de récurrences fréquentes ou d'atteinte à risque (proche macula etc.) (126).

c) Toxoplasmose de l'immunodéprimé

Quelques soient les causes de l'immunodépression (patients VIH, patients transplantés d'organe, patients greffés de CSH etc.) et les manifestations cliniques (encéphalites toxoplasmiques, ou bien atteintes pulmonaires, gastro intestinales etc.) le traitement repose systématiquement sur le même schéma thérapeutique (127,128).

Il comprend une phase d'induction d'environ 6 semaines, suivie d'une phase d'entretien d'une durée indéterminée (entre 6 mois et 1 an selon la réponse thérapeutique).

Les médicaments utilisés sont habituellement l'association PS et acide folinique (129) avec cependant de nombreux effets indésirables rapportés (130). L'association pyriméthamine clindamycine, ou bien le traitement par cotrimoxazole semble être aussi efficace et mieux toléré (131).

L'amélioration est souvent rapide après une semaine de traitement, et l'évaluation se fait sur les symptômes cliniques et non pas sur les images radiologiques (essentiellement dans le cas des encéphalites toxoplasmiques) qui peuvent être améliorées plus tardivement. La mise en route de ce traitement ne doit pas être retardée tout particulièrement en cas d'absence de traitement prophylactique au long cours. Cependant, pour les patients séropositifs au VIH, la prise en charge doit associer une levée de l'immunodépression (132).

3. Toxoplasmose congénitale

a) Programme national de prévention de la TC

En Europe, la prévention de la TC est rare, et ne concerne que peu de pays. Une étude menée en 2008 (81) dans 28 pays européens retrouve un système de monitoring du risque de TC dans 4 pays seulement : l'Italie, les Pays Bas, l'Allemagne et la France (133).

En France, un programme national de prévention de la TC a été mis en place en 1978 (75). Ce programme a deux objectifs. Le premier (134) est d'évaluer le statut sérologique de toutes les femmes enceintes dont l'immunité n'a pas été prouvée¹ ; et le second (depuis 1992) de surveiller mensuellement leurs sérologies au cours de la grossesse, en cas de sérologie négative².

Ainsi, devant une première sérologie négative en début de grossesse, un suivi mensuel sérologique est à réaliser ainsi que le suivi des règles de prévention de la toxoplasmose (Tableau II-1) (135).

¹ Arrêté du 19 avril 1985 modifiant l'arrêté du 27 août 1971 relatif aux examens médicaux pré- et postnatals. Journal Officiel 30 mai 1985

² Décret no92-143 du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré- et postnatal. Journal Officiel 16 février 1992.

<p>Eviter les infections par les kystes de <i>T. gondii</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - consommer la viande bien cuite, en particulier du porc, du mouton et de l'agneau : la viande doit être cuite au cœur du morceau à 67°C ou avoir été congelée trois jours à -12°C (la salaison et le fumage ne détruisent pas les parasites) - se laver les mains après avoir manipulé de la viande crue ; - nettoyer les surfaces et les ustensiles ayant été en contact avec de la viande crue (prévention des contaminations croisées)
<p>Eviter les infections par les oocystes de <i>T. gondii</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - une femme enceinte non immunisée peut garder son chat, dans la mesure où ce dernier ne rentre pas dans la cuisine, et où sa litière est changée par une autre personne, ou par elle-même, à condition de porter des gants et de se laver les mains ensuite. En outre, il est préconisé de réduire le risque d'exposition des chats domestiques en les gardant à l'intérieur, et en ne leur donnant que des aliments cuits, en conserve ou secs - porter des gants au moment de manipuler des substances (sable, terre, éléments de jardinage) pouvant avoir été contaminées par des selles de chat et bien se laver les mains et les ongles par la suite - bien se laver les mains et bien laver les ustensiles à la suite de la manipulation d'aliments souillés par de la terre ; - bien peler ou laver les fruits et légumes consommés crus ; - ne pas consommer de lait cru - consommer de l'eau embouteillée - éviter les fruits de mer

Tableau II-1 - Règles hygiéno diététiques à destination des femmes enceintes non immunisées par *T. gondii* (fait à partir des recommandations de l'HAS 2017) (122)

En cas de sérologie positive, aucune précaution n'est requise, une fois cette sérologie confirmée sur un nouveau prélèvement (49).

En cas de séroconversion toxoplasmique mise en évidence lors du suivi sérologique, la prise en charge est plus complexe et est détaillée ci-après.

b) Traitements utilisés en cas de séroconversion maternelle au cours de la grossesse

Avant d'évaluer le déroulement de la prise en charge d'une séroconversion toxoplasmique en cours de grossesse, il faut distinguer les différents traitements à notre disposition ainsi que la balance avantage/inconvénient dans leur utilisation en obstétrique.

La spiramycine est utilisée depuis plus de 30 ans en France, et les connaissances que nous avons sont grandes (121,136). Elle est non tératogène, se concentre dans le placenta mais ne passe pas la barrière placentaire, et n'est donc pas utilisée dans le traitement prénatal de la TC.

La bithérapie PS est aussi bien connue dans le milieu obstétrical. Elle a une action curative, bien que partielle, qui pourrait diminuer les séquelles fœtales. Elle est même déjà utilisée en traitement prophylactique dans certains pays comme l'Autriche (136,137). Toutefois, son potentiel tératogène au premier trimestre de grossesse est à prendre en compte pour sa prescription en per partum (138). A cela s'ajoute les précautions nécessaires à associer à sa prescription.

Les autres thérapeutiques de type atovaquone, pyriméthamine-clindamycine, pyriméthamine-azithromycine n'ont pas fait leur preuve en cours de grossesse et ne doivent donc pas être utilisées en prénatal. De même, le cotrimoxazole n'a pas montré de supériorité face à la bithérapie PS (139,140).

c) Prise en charge anténatale

(1) « Historique »

Chez les femmes dont le diagnostic de séroconversion toxoplasmique pendant la grossesse a été établi ou est fortement suspecté, il est recommandé de procéder à (1,138) :

- une information complète des parents dans un centre expert
- la mise en route dès que possible d'un traitement préventif de la transmission materno-fœtale du parasite, par spiramycine (141)
- une évaluation précise de l'âge gestationnel au moment de l'infection
- la proposition d'une amniocentèse afin de chercher le parasite dans le liquide amniotique.

Cet examen ne pourra être pratiqué qu'après au moins 16 semaines de grossesse afin de minimiser le risque de fausse couche (évalué à 0,5%), et au moins 4 semaines après la date présumée de l'infection maternelle (correspondant au délai moyen de transmission du parasite au fœtus). Ces recommandations ont pour but de diminuer le risque de résultats faussement négatifs

- un suivi échographique rapproché à la recherche de signes de toxoplasmose congénitale (122)
- un suivi clinique et biologique néo et post natal obligatoire

Dans le cas où l'amniocentèse a été acceptée par la patiente, la suite de la prise en charge dépendra du résultat de cet examen (1,142) :

- En cas de résultat négatif, le risque de toxoplasmose congénitale ne peut être exclu. Un traitement préventif par spiramycine initié dès le diagnostic de l'infection maternelle sera poursuivi jusqu'à l'accouchement afin de prévenir la transmission verticale du parasite. Le suivi échographique régulier doit par ailleurs être maintenu (49,136,143).

- En cas de résultat positif, la toxoplasmose congénitale est affirmée et un traitement curatif par PS est mis en place à la place de la spiramycine, associé à un suivi échographique bimensuel systématique. Cette toxoplasmose congénitale est notifiée anonymisée au réseau de surveillance ToxoSurv.

En cas d'amniocentèse non réalisée, le traitement par spiramycine est poursuivi jusqu'à l'accouchement

(2) Ouverture sur un nouveau protocole thérapeutique ?

Devant l'absence d'essai comparatif randomisé concluant (80,145), la question de mettre en place en première intention la bithérapie PS à la place de la spiramycine pour prévenir le risque de transmission materno-fœtale de *T gondii*, est soulevée (76,134). A l'heure actuelle, il n'existe qu'un seul essai clinique répondant en partie à cette question.

L'étude Toxogest (146), étude randomisée, contrôlée, prospective et multicentrique, s'est déroulée en France entre 2010 et 2014. Celle-ci suggère que la bithérapie PS semble mieux prévenir la toxoplasmose congénitale que la spiramycine en cas de séroconversion en cours de grossesse. Cette différence n'était toutefois pas statistiquement significative par un nombre d'inclusion de patientes trop insuffisant. Cependant, il semblerait exister une supériorité de la bithérapie PS lorsqu'elle a été initiée dans les 3 semaines suivant la séroconversion (avant que les tachyzoïtes ne traversent le placenta) avec un effet bénéfique de celle-ci sur la diminution des signes radiologiques cérébraux des fœtus. Il est cependant à noter qu'en plus de confirmer la toxicité hématologique, l'utilisation de PS pourrait diminuer la sensibilité de détection des TC en prénatal.

Un groupe d'expert français en toxoplasmose congénitale (85,121,147) propose d'adopter un nouveau protocole de prise en charge devant une séroconversion toxoplasmique maternelle prouvée, en s'appuyant sur une analyse de la littérature dont la publication de l'étude Toxogest et sur l'éditorial associé de Montoya (147).

Cette proposition prend en compte deux constats : le risque de transmission verticale du parasite augmenté à partir de la 14^{ème} SG ; et le fait que la bithérapie PS est tératogène pour le fœtus au 1^{er} trimestre, mais qu'elle est aussi le seul traitement efficace dans le cas d'une TC congénitale prouvée en anténatal.

Ainsi, leur protocole se divise en 3 situations :

- en cas de séroconversion diagnostiquée à moins de 14 SG, un traitement préventif par spiramycine est mis en route sans attendre. Il sera switché par la bithérapie PS si le diagnostic de TC est posé (résultat d'amniocentèse positif). Son but est ici de diminuer le risque de transmission verticale du parasite et donc le risque d'infection fœtale, par accumulation dans le placenta, tout en restant le moins délétère possible pour la tolérance du traitement.
- en cas de SC diagnostiquée au 3^{ème} trimestre, un traitement préventif par la bithérapie PS est mis en route en première intention, et sera switché par de la spiramycine si l'amniocentèse a rendu un résultat négatif. Son but est de

diminuer l'infection fœtale, à la fois en évitant sa transmission verticale mais aussi en traitant le fœtus en cas de possible atteinte.

- en cas de SC au 2^{ème} trimestre de grossesse, le choix d'un traitement par PS, ou par spiramycine est laissé à l'initiative du prescripteur, et se poursuivra jusqu'à l'accouchement selon le résultat de l'amniocentèse :
 - par la bithérapie PS en cas de liquide amniotique positif
 - par de la spiramycine en cas de liquide amniotique négatif

Les auteurs affirment que ce protocole n'est toutefois pas idéal. Il existe en effet un risque de faux négatifs non négligeable du diagnostic prénatal (transmission tardive du parasite au fœtus, ou faux négatif de la technique PCR) et un risque de compliance faible au traitement due à ses effets secondaires nombreux nécessitant une prise en charge adéquate. Une nouvelle étude semble donc être nécessaire.

d) Prise en charge néonatale et postnatale

Dans le cadre d'une séroconversion toxoplasmique en cours de grossesse, le suivi néonatal est systématique, qu'il y ait eu ou non la preuve de toxoplasmose congénitale en période anténatale (absence d'amniocentèse ou amniocentèse négative par exemple) (122). Seuls les bébés atteints de toxoplasmose congénitale doivent être traités et le plus rapidement possible après le diagnostic.

Il est alors indispensable de procéder à un examen clinique complet de l'enfant, un bilan biologique avec recherches sérologiques et parasitaires, et un bilan paraclinique comprenant une échographie transfontanellaire et un fond d'œil (FO) (1).

Les examens biologiques ont pour objectif de détecter les faux négatifs du diagnostic prénatal et de s'assurer de l'absence d'une transmission tardive du parasite au fœtus pour conclure définitivement sur le statut de l'enfant (1).

Les examens paracliniques quant à eux, ont pour but d'évaluer les possibles séquelles en cas d'infection, en recherchant des calcifications intracrâniennes ou une hydrocéphalie des ventricules cérébraux, ou encore des signes de chorioretinite au FO (85).

L'HAS 2017 recommande un premier bilan initial néonatal du nouveau-né à J0-J3 associé à une échographie transfontanellaire et un fond d'œil si possible. Ces examens biologiques seront reproduits au minimum à J15 et J30 de vie.

A l'issue de cette prise en charge clinique, paraclinique et biologique initiale, 2 situations se dégagent :

(a) Examens néonataux (et anténataux) négatifs

Cela représente près de 80% des situations en France.

Il est recommandé (1) un suivi basé sur la réalisation conjointe d'un panel d'examens biologiques sérologiques la première année de vie. Cette surveillance sert à confirmer la disparition complète des IgG maternels signant l'absence de toxoplasmose congénitale (85,148). Au contraire en cas d'augmentation des d'IgG, apparition d'IgM ou IgA, ou en

cas de sérologie positive à 1 an de vie, un traitement et une surveillance adéquate seront à mettre en place (cf. ci-dessous)

(b) Examens néonataux positifs ou diagnostic anténatal positif

Ces examens, quels qu'ils soient, signent la toxoplasmose congénitale et la nécessité de mise en route d'un traitement dès le diagnostic affirmé, même en l'absence de symptômes (94,121,149).

Plusieurs protocoles sont actuellement utilisés, chacun durant 12 mois :

- bithérapie PS avec acide folinique pendant 12 mois
- bithérapie par sulfadoxine pyriméthamine avec acide folinique pendant 12 mois
- bithérapie par PS pendant 2 mois suivi de 10 mois de bithérapie par sulfadoxine pyriméthamine

Davantage d'effets indésirables sont recensés avec la combinaison sulfadoxine pyriméthamine, mais ce protocole présente l'avantage d'être à prendre en 2 fois par semaine, contrairement à la fréquence biquotidienne de l'association PS. En cas d'atteinte oculaire, il est courant d'associer des corticoïdes. Les surveillances spécifiques à chaque traitement sont à prévoir (NFS pour PS), ainsi que les suivis cliniques et ophtalmologiques habituels tous les 3 mois au minimum. Par ailleurs, le suivi sérologique est systématique, et mettra normalement en évidence la disparition des IgG (150). Un rebond sérologique à l'arrêt du traitement est couramment retrouvé (151) sans conséquence clinique, et ne doit pas motiver la reprise d'un traitement.

Le suivi paraclinique ophtalmologique doit être réalisé de façon rapprochée dans l'enfance, puis de façon annuelle tout au long de la vie. Il comprend systématiquement un fond d'œil et recherche des signes de chorioretinite, pouvant parfois apparaître très à distance de la naissance. Des cas de récurrences à la fois dans l'enfance, l'adolescence ou même durant la grossesse ont été décrits dans la littérature (152). Dans ces cas, la reprise d'un traitement pour une durée de 3 mois est recommandée, possiblement à base de cotrimoxazole (153) plus ou moins associé aux corticoïdes dans certaines indications.

Enfin, le suivi des nouveau-nés atteints de TC au-delà de la première année de vie ne fait pas l'objet d'un consensus. Mais on admet devoir poursuivre celui-ci tous les 3 mois la 2^{ème} année de vie, puis tous les 6 mois la 3^{ème} année de vie, et enfin, tous les ans secondairement pour une durée peu précise (154).

III. DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGÉNITALE

Le diagnostic de la toxoplasmose congénitale repose sur un faisceau d'arguments qui comprend à la fois des arguments cliniques parfois étayés par des arguments radiologiques, mais surtout confirmés par des arguments biologiques. Ce sont ces derniers sur lesquels nous allons nous focaliser dans cette partie.

A. *Diagnostic de la séroconversion maternelle*

Une suspicion de toxoplasmose congénitale est toujours secondaire à une situation de séroconversion maternelle au cours de grossesse ou juste avant la grossesse, que celle-ci ait été prouvée ou non.

La Haute Autorité de Santé a publié en 2017 une revue générale sur le diagnostic de la toxoplasmose générale ou oculaire (chez les immunocompétents, les femmes enceintes, les immunodéprimés) en s'appuyant sur les dernières études menées (1,128).

L'interprétation des sérologies (initiales ou de suivi) des femmes enceintes immunocompétentes respecte un algorithme décisionnel développé ci-dessous :

(a) *IgG - / IgM -*

On peut exclure une infection récente datant de 7 jours ou plus avant le prélèvement. Il est recommandé un suivi sérologique mensuel ainsi que le respect des règles d'hygièno-diététiques de prévention.

(b) *IgG + / IgM -*

Cela correspond habituellement à une immunité ancienne, cependant il est recommandé de confirmer cette sérologie sur un second prélèvement à 3 semaines pour évaluer la stabilité du taux des IgG et écarter le risque d'infection aiguë sans IgM. En cas d'augmentation du taux des IgG, il est nécessaire de réaliser un test d'avidité pour dater l'infection.

(c) *IgG - / IgM +*

Cette situation correspond soit à une infection aiguë soit à la détection d'IgM non spécifiques. Ces derniers doivent avant tout être confirmés par une deuxième méthode diagnostique utilisant un principe différent (ISAGA, IFI). L'apparition d'IgG prouverait la séroconversion maternelle. En dehors de ce contexte, un troisième prélèvement sera demandé à 2 semaines à la recherche de cette séroconversion avant de conclure sinon, à un faux positif en IgM.

(d) *IgG + / et IgM +*

Cette situation correspond là encore à une suspicion d'infection récente. L'objectif est de réussir à dater l'infection en s'aidant si besoin de sérums antérieurs de la patiente. Le test d'avidité est réalisé en première intention et si celui-ci n'est pas contributif, la cinétique des IgG faite sur 2 prélèvements espacés de 2-3 semaines, nous permettra de dater l'infection. Effectivement, en cas de doublement du titre des IgG en absence de traitement, l'infection aurait été acquise dans les 2 à 3 mois précédant le premier prélèvement. Autrement, nous ne pouvons pas conclure, et le suivi sérologique sera de mise. L'interprétation de ces résultats doit tenir compte de l'âge gestationnel au moment du prélèvement.

(e) *IgG à titres équivoques*

Il s'agit d'un statut immunitaire indéterminé, qui doit être analysé dans un centre de référence, par des techniques de type Immunoblot, plus rarement Dye Test voire Immunofluorescence (1).

B. Méthodes diagnostiques biologiques de la toxoplasmose congénitale et interprétations

Comme nous avons pu le voir ci-dessus, en cas de séroconversion maternelle, une amniocentèse est réalisée (avec accord de la patiente). Le placenta, ainsi que le sang de cordon et du nouveau-né sont analysés à l'accouchement, en parallèle du sang maternel. Ces échantillons biologiques serviront de base indispensable à l'ensemble des techniques diagnostiques dans le but de confirmer la présence ou l'absence d'atteinte fœtale.

1. En période anténatale

En cas d'infection aigüe maternelle suspectée (ou prouvée), une amniocentèse doit être proposée à la patiente afin de rechercher la présence du parasite dans le liquide amniotique (LA) (138,155).

Deux techniques sont pour cela utilisées : l'inoculation à la souris, maintenant de moins en moins pratiquée, et la PCR en temps réel.

(1) Inoculation à la souris du liquide amniotique

Malgré le fait que cette technique d'isolement du parasite ne soit plus indispensable elle est restée pratiquée à Nantes jusqu'en avril 2019.

Au CHU de Nantes, deux souris sont inoculées avec le liquide amniotique. L'inoculation consiste en l'injection intra-péritonéale de 1 mL de LA à une souris naïve de tout contact avec le parasite *T. gondii*. Une surveillance minimale de 4 semaines est nécessaire pour évaluer le comportement de ces souris à la recherche de particularité signant une possible infection (poils hérissés, prostration etc.). Cette surveillance se termine par la pratique d'une sérologie à 4 semaines de l'inoculation pour chacune des souris inoculées. Celle-ci est pratiquée par la méthode ToxoScreen-DA de Biomérieux utilisant la technique d'agglutination directe. Une sérologie positive signe une séroconversion chez la souris et donc la présence de parasites viables dans le LA inoculé. La confirmation définitive est réalisée par visualisation des kystes cérébraux de *T. gondii*.

(2) PCR en temps réel sur liquide amniotique

Cette technique de PCR en temps réel est considérée comme la méthode de choix pour le diagnostic prénatal, au vu de sa forte sensibilité, sa rapidité d'exécution, sa robustesse et sa reproductibilité. Le CNR recommande un rendu qualitatif et non quantitatif du résultat, pour éviter de mauvaises interprétations au vu de la variabilité inter laboratoire (85).

Au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes, nous utilisons le kit BioEvolution.

La quantité de LA nécessaire est estimée à 2 mL. Ce volume est centrifugé puis 200 µL sont prélevés en vue de l'extraction. Celle-ci est effectuée par l'automate Magna Pur compact (Roche) et l'amplification est faite le jour même sur le thermocycleur Qiagen (Rotor Gene). Cette PCR est dorénavant pratiquée 2 fois par semaine (lundi et jeudi), et les résultats sont disponibles le soir même.

Quelle que soit la technique utilisée, en cas de résultat positif, le diagnostic de toxoplasmose congénitale est retenu et confirmé. La suite de la prise en charge sera donc poursuivie en fonction et le cas de toxoplasmose congénitale peut être notifié au CNR Toxoplasmose.

A l'inverse, on ne peut conclure sur un résultat négatif, celui-ci ne pouvant pas exclure une toxoplasmose congénitale (10% de LA négatif malgré une TC). Il sous-entend donc la poursuite obligatoire de la surveillance mise en route initialement.

2. A l'accouchement et en période néonatale

En cas d'absence ou de négativité du diagnostic prénatal de toxoplasmose congénitale, il est recommandé par l'HAS (156) de procéder à plusieurs examens, dont les suivants, qui sont pratiqués à Nantes en routine (Figure III-1).

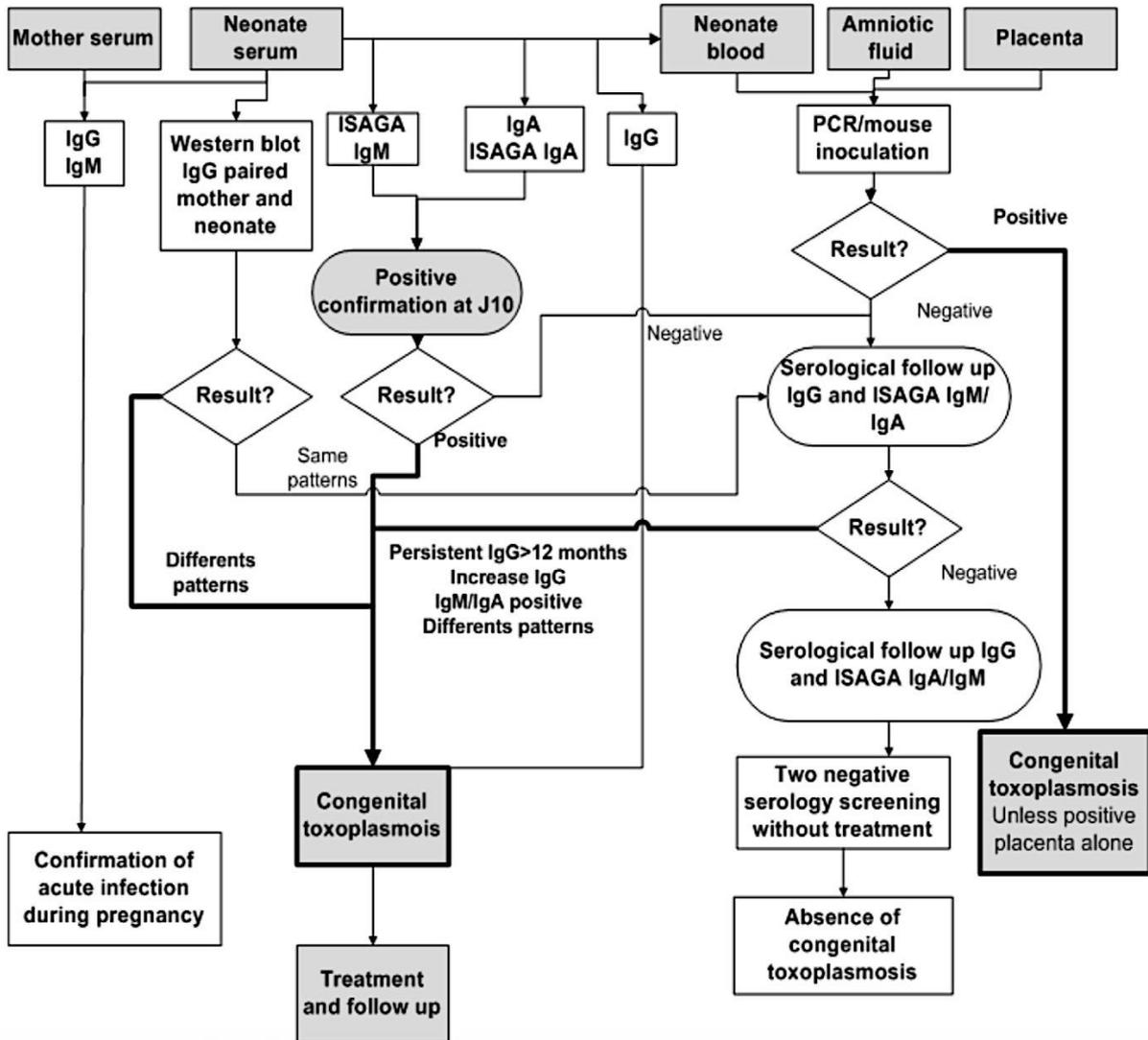


Figure III-1 : Conduite à tenir devant les examens néonataux d'un enfant né d'une mère ayant eu une séroconversion toxoplasmique pendant la grossesse (156)

(1) Sérologie des IgG, IgM et IgA sur sérum ou sang de cordon du nouveau-né par ELISA

La détection des anticorps est primordiale dès les premières heures de vie du nouveau-né. En effet, leur cinétique sera indispensable pour évaluer la présence ou l'absence d'une transmission materno-fœtale du parasite. Ces méthodes sérologiques sont donc au centre du diagnostic biologique de toxoplasmose congénitale, mais leur interprétation doit être faite par des personnes expérimentées.

A Nantes, nous utilisons la technique immunoenzymatique ELISA des automates Vidas et Architect, associée à une méthode de détection par chimiluminescence pour la détection des IgG et IgM. Les IgM sont détectés par la technique ISAGA (Biomérieux) et les IgA par technique immunocapture double sandwich (Biorad).

Les IgG (transmis par la mère par transport actif à travers le placenta au cours de la grossesse) et parfois les IgM et/ou IgA (par fuite placentaire au cours de l'accouchement) peuvent être détectables dans le sérum du nouveau-né, alors qu'ils sont

d'origine maternelle. Ces anticorps maternels disparaissent après la naissance selon des demi-vies de l'ordre de 3-4 semaines pour les IgG, 5 jours pour les IgM, et 10 jours pour les IgA. C'est pourquoi la surveillance de leur titre jusqu'à leur disparition complète est indispensable pour conclure à l'absence de toxoplasmose congénitale.

A Nantes, et en accord avec les dernières recommandations de l'HAS 2017, la recherche se fait comme suit :

- Concernant les IgM et les IgA, en cas de résultat positif, il est indispensable de refaire le test pour confirmer ce résultat et s'abstenir des faux positifs issus des anticorps maternels. Ce deuxième test est en principe fait entre 5 et 10 jours après le premier et sera de nouveau pratiqué en cas de persistance de la positivité, à plus de 10-15 jours de vie.
- Concernant les IgG, qui sont des anticorps traversant la barrière placentaire au cours de la grossesse, l'objectif du suivi est d'évaluer la cinétique de croissance ou décroissance des titres au cours de la vie du nouveau-né. En effet, un enfant né d'une mère infectée aura initialement des IgG anti *T. gondii* maternelles à des taux souvent plus élevés que ceux de la mère. Secondairement, toute modification de la courbe classique (qui correspond à une décroissance des IgG, selon la demi-vie connue), que ce soit par stabilisation ou augmentation des titres, est indicatrice d'une toxoplasmose congénitale. Il faut cependant rester très prudent devant la possibilité d'une négativation des taux d'IgG en cas de traitement en cours chez le nouveau-né (155). C'est la raison pour laquelle il est recommandé que ces recherches soient faites dans un laboratoire expert du diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

Le CNR a mis au point un algorithme de surveillance des sérologies en postnatal, qui est développé dans la suite de ce travail.

(a) *Recherche IgA et IgM ISAGA*

Cette technique est la technique recommandée pour détecter les IgM. Elle est notamment à privilégier chez les jeunes enfants et les nouveau-nés qui ont souvent des taux faibles en IgM.

A Nantes, les ISAGA IgM sont recherchés en routine dans les bilans initiaux des nouveau-nés suspects de toxoplasmose congénitale. La technique est faite une fois par semaine et se déroule sur 24h (étape d'incubation nocturne). En cas de résultat positif, celui-ci devra être confirmé sur un deuxième sérum prélevé à distance, afin d'évaluer la cinétique des anticorps, et de confirmer ou non, une toxoplasmose congénitale.

(b) *Profil comparé IgG et IgM mère-enfant*

La quantification simple des IgG par la méthode ELISA est rarement utile à la naissance étant donné la présence d'IgG d'origine maternelle, présentes à la fois chez la mère et chez le nouveau-né. C'est pourquoi la comparaison des profils immunologiques en IgG anti-*Toxoplasma* par Immunoblot sur échantillons de sérums appariés mère-enfant est indispensable.

Il s'agit d'une méthode comparative et qualitative, permettant de mettre en évidence les différents types d'IgG. Ces derniers, d'origine maternelle ou du nouveau-né, peuvent avoir pour cible des déterminants antigéniques différents, ce qui sera alors visible sur les résultats de cette analyse sous forme de bandes supplémentaires (Figure III-2)

Le kit utilisé au CHU de Nantes est le kit LDBio Toxo IgG/IgM. Il est nécessaire d'avoir 35 µL de sérum maternel au jour de l'accouchement et 35 µL de sérum du nouveau-né (10 µL pour les IgG et 25 µL pour les IgM).

La comparaison des deux profils (Figure III-2) pourra déterminer si les IgG présentes chez l'enfant sont le reflet d'une néosynthèse d'IgG par l'enfant (présence d'un ou plusieurs bandes différentes) et donc d'une infection active, ou d'un simple transfert d'anticorps maternels (bandes similaires sur les deux profils comparés).

Il en est de même pour les IgM, retrouvées dans le sérum du nouveau-né, qui peuvent

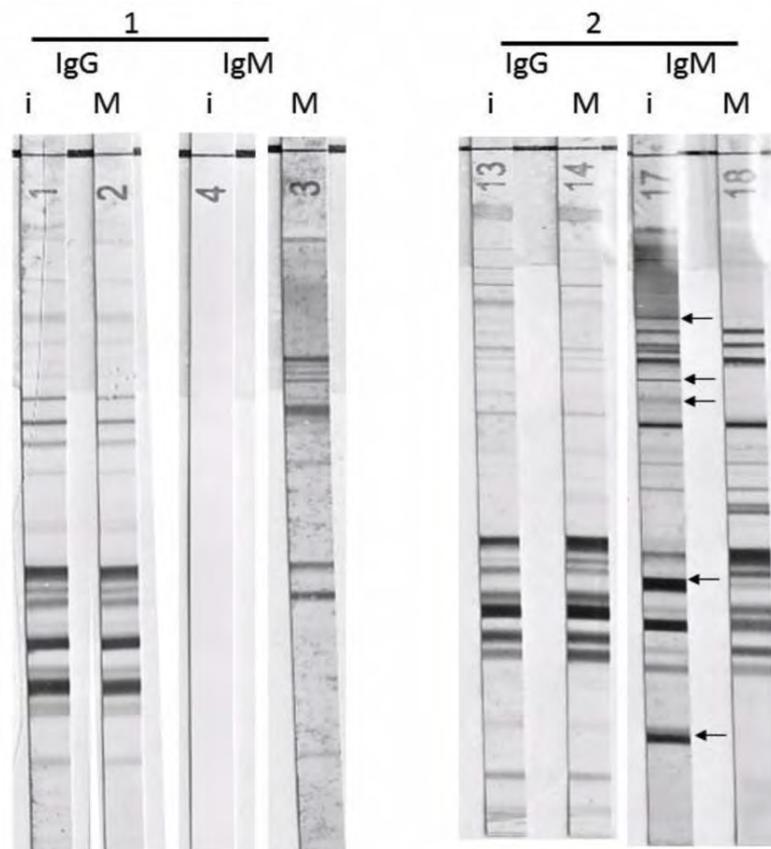


Figure III-2 : Immunoblot de comparaison mère (M) et enfant (i) à la naissance :
1 : Absence de bande supplémentaire en IgM et profil identique en IgG en faveur d'une transmission passive d'IgG maternelle à l'enfant. 2 : Profil IgG identique avec bande supplémentaire en IgM, confirmant une toxoplasmose congénitale (156).

aussi avoir une origine maternelle après fuite placentaire lors de l'accouchement. Ici encore, l'objectif est de discriminer une néosynthèse d'IgM par l'enfant (présence d'une ou plusieurs bandes différentes) d'une contamination (profil identique).

A Nantes, les profils comparés IgM sont fait systématiquement en cas de suspicion de toxoplasmose congénitale, quelque soit le résultat du test ISAGA. Dans certains cas

seulement, on ne peut y procéder : quantité insuffisante de sérum, absence de sérum maternel à l'accouchement.

Les résultats sont à interpréter avec finesse étant donné qu'il a été montré que les IgM peuvent prendre plusieurs semaines, jusqu'à 2 mois, avant de se positiver et qu'un traitement (prénatal ou en cours) peut donner des faux négatifs, en cachant la néosynthèse d'anticorps (74).

On retrouve dans la littérature que l'Immunoblot serait légèrement plus sensible que l'ISAGA pour la détection des IgM chez l'enfant. C'est pour cela que cette technique est considérée comme complémentaire, d'autant plus en cas de résultat négatif de l'ISAGA (9,157). Cette dernière information fera l'objet de notre deuxième travail expérimental.

Les profils comparés ne peuvent pas être utilisés au-delà de l'âge de 1 mois pour les IgM et de l'âge de 3 mois pour les IgG en raison du risque de détection d'anticorps dits naturels, avec une interprétation faussement positive du test.

(2) Inoculation à la souris du sang cordon (ou du sang du nouveau-né) et du placenta (rarement du liquide amniotique)

Un millilitre de sang de cordon est injecté dans 2 souris, et 6 souris sont injectées avec du placenta préparé : 1 mL dans 3 souris, et 2 mL dans 3 autres souris. Le protocole de préparation des placentas est développé dans notre travail expérimental. De la même manière qu'en diagnostic prénatal avec le liquide amniotique, des sérologies sont pratiquées sur les souris, après 4 semaines de surveillance, afin d'évaluer leur statut immunitaire vis à vis de la toxoplasmose.

(3) PCR du sang de cordon (ou du sang du nouveau-né) et du placenta (rarement du liquide amniotique)

Les modalités pratiques de la PCR sur le sang de cordon au CHU de Nantes sont bien maîtrisées puisque identiques à la technique utilisée pour les sangs totaux des patients immunodéprimés. L'extraction est réalisée à partir de 200 µL de sang prélevé sur EDTA. Le kit d'extraction et le kit de PCR utilisés sont les mêmes que pour l'analyse des liquides amniotiques par PCR.

Cependant, dans le cadre de la PCR sur placenta, aucun protocole d'extraction n'était disponible jusqu'alors. Ainsi, malgré la présence d'un kit de détection adéquate, cette technique n'était pas utilisée en routine. La mise au point d'une méthode d'extraction optimale du matériel génétique placentaire a fait l'objet d'un premier travail de thèse en 2018, qui a été à l'origine de notre travail, développé dans la deuxième partie.

La mise en évidence du parasite dans le sang de cordon ou le liquide amniotique prélevé à la naissance, que ce soit par PCR ou par inoculation à la souris, affirme le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

Cependant, en cas de résultat positif pour l'étude du placenta, nous ne pouvons conclure en raison de cas documentés de « placentite isolée » c'est à dire sans transmission du parasite au fœtus (158).

3. En période post natale

Même si l'ensemble des résultats des examens faits en prénatal et en néonatal sont négatifs, il est indispensable de poursuivre la surveillance biologique de l'enfant en post natal. Le but est de ne pas méconnaître une toxoplasmose congénitale tardivement décelable, ou au contraire, affirmer définitivement l'absence de toxoplasmose congénitale.

Les examens biologiques nécessaires ont fait l'objet d'une audition du CNR en 2017 et sont faits comme suit au CHU de Nantes :

- La quantification précise des IgG entre J0 et J3 et J15.
- La recherche des IgM par ISAGA et des IgA par ISAGA doit être faite entre J0 et J3, plus ou moins répétée à J15 en cas de premier résultat positif.
- Le profil immunologique comparé mère/enfant à J3

La surveillance secondaire est faite habituellement au minimum à M1 (1 mois de vie) puis M3, M6, M9, M12. Celle-ci peut être rapprochée en cas de nécessité (résultats discordants, difficilement interprétables etc.).

La persistance d'anticorps anti *T. gondii* à l'âge de 12 mois fait poser le diagnostic de TC (142,156). Il en est de même en cas d'apparition d'IgM ou d'IgA au cours du suivi.

Au contraire, la disparition complète des anticorps maternels au plus tard à l'âge de 12 mois (en absence de traitement) confirme définitivement l'absence de toxoplasmose congénitale.

En cas de doute, ou dans certains cas particuliers, il est parfois utile de combiner à ce suivi sérologique d'autres techniques, notamment les profils comparés IgG et IgM mère/enfant, ou enfant/enfant. En effet la répétition de ces derniers peut mettre en évidence l'apparition d'une (ou plusieurs) nouvelle bande plus ou moins franche. Ils peuvent être répétés jusqu'à M1 pour les IgM et M3 pour les IgG.

PARTIE 2 :
Étude expérimentale

I. ETUDE PROSPECTIVE COMPARATIVE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE A PARTIR DU PLACENTA : INOCULATION A LA SOURIS *VERSUS* BIOLOGIE MOLECULAIRE PAR qPCR

A. *Introduction*

Le diagnostic de toxoplasmose congénitale en post partum comprend la recherche du parasite au sein du placenta. Au CHU de Nantes, l'étude du placenta dans le cadre de suspicion de toxoplasmose congénitale chez les femmes ayant fait une séroconversion au cours de leur grossesse, se faisait exclusivement par la méthode de l'inoculation à la souris.

En 2018, un protocole d'extraction a été mis au point et validé au cours d'une étude rétrospective (2) comparant l'inoculation à la souris *versus* qPCR sur 94 placentas. Cependant, ce travail rétrospectif a été réalisé sur une collection de placentas trypsinés, conservés à -20°C depuis 2008 pour certains.

L'objectif principal de notre étude était de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude rétrospective (bonne concordance entre les deux techniques comparées) pour utiliser en routine la technique qPCR sur placenta dans le diagnostic de toxoplasmose congénitale au CHU de Nantes, et ainsi abandonner la technique par inoculation à la souris.

Le protocole de pré-traitement des échantillons retenu à l'issue du travail de thèse de Coralie GUYONNAUD (Figure I-1) a servi de base et a été adapté pour définir le protocole définitif utilisé au cours de notre étude. En effet, le travail en routine impose différentes contraintes à respecter (amplitude des horaires de travail, disponibilité des automates, autres techniques à réaliser) pour permettre une gestion adéquate des échantillons au sein de l'activité quotidienne du laboratoire du CHU de Nantes. Il a été donc primordial d'adapter ce protocole afin que celui-ci devienne utilisable au quotidien par les techniciennes du laboratoire.

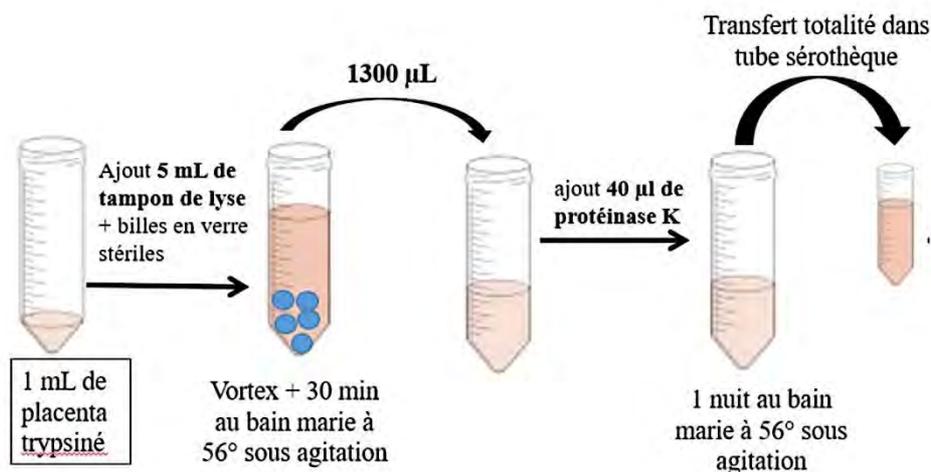


Figure I-1 : Protocole définitif de pré-traitement des échantillons de placenta, élaboré par C. GUYONNAUD (2)

Deux points ont notamment été retravaillés : la durée d'incubation avec la protéinase K et la fréquence d'extraction des placentas.

(1) Etape d'incubation des échantillons de placenta lysés associés à la protéinase K

Premièrement, il a été nécessaire de valider les différentes possibilités d'incubation avec la protéinase K afin de choisir celle qui répondra au mieux aux besoins du service. Effectivement, le matériel, notamment le bain-marie chauffant, mais aussi les horaires de travail des techniciennes et la disponibilité de l'automate d'extraction ont été des paramètres à prendre en compte afin d'optimiser au mieux cette technique. Chacun de ces paramètres ont été étudiés dans un premier temps de « mise au point » avant l'étude prospective à proprement parler.

(2) Evaluation de la fréquence de réalisation de la technique d'extraction

Il a fallu ici prendre en compte à la fois le temps nécessaire à la réalisation de la technique, la disponibilité du matériel ainsi que la gestion des stocks réactifs. Les techniques de biologie moléculaire nécessitent des contrôles et notamment pour chaque série, un témoin d'extraction est associé aux échantillons. Ces différents paramètres ont été à mettre en parallèle avec le nombre et la fréquence d'échantillons reçus par semaine et le degré d'urgence de l'analyse.

B. *Matériels et méthodes*

1. Préparation des placentas

Les placentas ont été préparés selon le protocole établi au sein du service de Parasitologie Mycologie du CHU de Nantes. Il était nécessaire que les placentas soient reçus entiers, dans un contenant approprié, et dans un délai raisonnable (n'excédant pas 5 jours) pour réduire au maximum le risque de pullulation bactérienne. Ils ont été traités soit le jour même, soit le lendemain du jour de réception (si reçus après 12h) ou plus rarement à J+2 en cas de réception le vendredi après 12h ou veille de jours fériés. Dans ces derniers cas, les placentas ont été conservés à +4°C, en présence de Pénicilline G afin d'éviter la pullulation bactérienne selon les recommandations du CNR.

Leur préparation a commencé par la sélection puis le prélèvement de plusieurs zones d'intérêt (membranes, cotylédons). L'ensemble d'environ 100g a ensuite été broyé puis

mis en présence d'une solution de trypsine et d'antibiotique au cours d'une incubation de 2h. Ces échantillons trypsinés ont été conservés au congélateur à -20° jusqu'à leur extraction.

2. Mise au point du protocole

a) Echantillons

Afin d'optimiser notre protocole, nous avons utilisé deux échantillons de placentas trypsinés connus positifs, conservés à -20°C.

b) Protocoles

Ces échantillons ont été traités selon 2 protocoles qui différaient du protocole initial par :

- une incubation au cours de la journée (et non de la nuit) au bain-marie
- une incubation au cours de la journée au sein d'un bloc chauffant (et non d'un bain-marie)

Nous avons pu aussi évaluer le temps minimal d'incubation nécessaire pour une bonne interprétation des résultats.

3. Etude prospective

a) Echantillons

Notre étude a porté sur des placentas de femmes ayant présenté une séroconversion toxoplasmose au cours de leur grossesse et acheminés dans les meilleurs délais vers notre laboratoire. Cette étude prospective s'est déroulée du 2 novembre 2018 au 30 avril 2019.

b) Protocole d'extraction

Les échantillons trypsinés congelés ont secondairement été traités selon le protocole validé à l'issue du travail de thèse de Madame GUYONNAUD, protocole modifié suite à notre travail de mise au point (Annexe).

L'étape de préparation de l'extraction a été faite à l'aide du Kit Extraction RSC Blood DNA (Promega) comprenant le tampon de lyse CLD (Promega). Les échantillons décongelés ont été lysés puis incubés en présence de protéinase K. Les lysats à extraire ont été obtenus.

L'étape d'extraction, à l'aide du Kit Extraction RSC Blood DNA (Promega) et de l'extracteur Maxwell© (Promega) a permis d'obtenir le matériel génétique à analyser. Les éluats d'ADN ont été conservés congelés à -20°C en attendant leur amplification par PCR.

c) Etape de qPCR

L'amplification par PCR a été faite au sein du laboratoire et selon la fréquence habituelle de réalisation de la PCR, à savoir les lundis, mercredis et vendredis. Les ADN ont été analysés de la même manière que les autres prélèvements issus de l'activité de routine du service, à l'aide du kit PCR *Toxoplasma* (BioEvolution). Les résultats ont été disponibles dans la journée.

Ce kit repose sur une réaction de PCR, donc d'une amplification d'acides nucléiques spécifiques associée à la détection en temps réel de l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase par un système de détection de la fluorescence.

Il contient une sonde TaqMan (Figure II-12 de la partie 1) spécifique de *T. gondii* ciblant l'élément répété REP 529 présent entre 200 à 300 copies/génome, marquée par le fluorochrome FAM. Il y est associé un contrôle interne, comprenant une sonde spécifique, marquée par le fluorochrome HEX. Chacune de ces sondes émettra une fluorescence spécifique en cas d'hydrolyse, quantitativement proportionnelle à la quantité des produits d'amplification (Figure I-2)

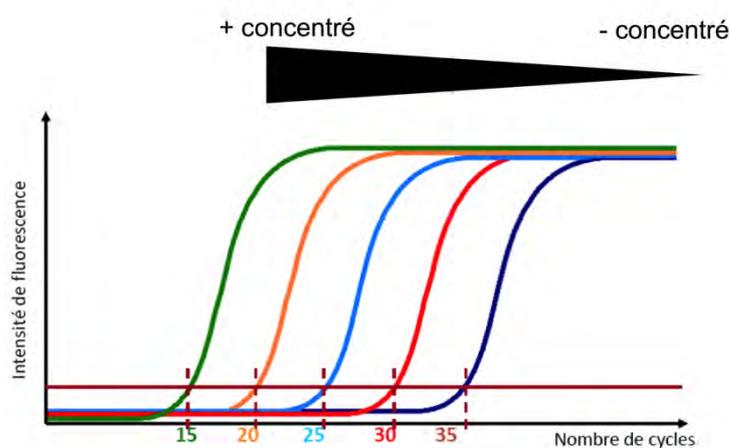


Figure I-2 : Courbes d'amplification d'une PCR en temps réelle.

Le contrôle interne permet de vérifier l'absence d'inhibiteurs de PCR, et de valider la technique. Les inhibiteurs de PCR peuvent se trouver dans le prélèvement ou dans les réactifs utilisés pour l'extraction. Pour confirmer leur absence, le kit de PCR amplifie une séquence nucléotidique donnée, connue et ajoutée dans chacun de nos échantillons. L'absence de détection de son signal nous conduirait à conclure à la présence d'un inhibiteur de PCR. En cas de bonne amplification de celui-ci, l'interprétation de nos résultats est permise.

Un deuxième contrôle, positif externe cette fois-ci, y est associé pour déterminer la charge parasitaire. Celui-ci est testé en double, il correspond à 0,2 et 20 équivalents génomes de *Toxoplasmes*/μL.

Conjointement à ces 2 contrôles, interne et externe, est associée une PCR albumine qui détecte la présence d'albumine humaine au sein des extraits d'ADN et permet ainsi l'interprétation des résultats.

C. Résultats

1. Mise au point du protocole

Douze échantillons de placentas ont été étudiés : les deux échantillons d'intérêt permettant de valider notre protocole et dix échantillons supplémentaires de placentas, en vue de maîtriser la technique par l'opérateur (Annexe 1).

Le tableau I-1 présente les résultats de PCR *Toxoplasma* (résultats quantitatifs et qualitatifs) et des inoculations à la souris des deux échantillons sur lesquels nous avons travaillé durant la phase de mise au point : échantillon 3 et échantillon 1. Ces 2 échantillons ont été analysés à 2 reprises mais avec des protocoles différents.

Manip	Echant	Date	Protocole	Incub	Inoc	PCR	Ct <i>Toxo</i>
0	3A	18.05	Incubation au bain marie sur la nuit	8h	+	+	27,07
1	3B	18.05	Incubation au bain marie sur la journée	5h15		+	25,20
	1A	29.09			+	27,99	
3	1B	29.09	Incubation en bloc chauffant sur la journée	7h	+	+	25,57

Tableau I-1 : Résultats PCR versus Inoculation à la souris durant l'étape de mise au point

Légendes : Manip = numéro de la manipulation ; Echant = Numéro d'échantillon ; Date = Date du prélèvement ; PCR = Résultat de la PCR *Toxoplasma* ; Inoc = Résultat de l'inoculation ; Incub = Temps d'incubation ; Signe - = résultat négatif ; signe + = résultat positif

L'échantillon 3 a été étudié initialement avec le protocole de la thèse de Coralie GUYONNAUD et est sorti positif avec un cycle seuil (Ct) à 27,07 à l'issue d'une incubation sur la nuit au bain-marie. Ce même échantillon a été repassé lors de la manipulation 1 avec une incubation au bain-marie de 5h15 sur la journée. Les valeurs de Ct après amplification par PCR de cet échantillon sont ressorties comparables avec un Ct de 27,07 pour la manipulation initiale, et un Ct de 25,20 pour la manipulation 1.

L'échantillon 1 a aussi été analysé à deux reprises : lors de la manipulation 1, au cours d'une incubation au bain-marie sur la journée de 5h15, et lors de la manipulation 3 au cours d'une incubation sur la journée en bloc chauffant. Les valeurs de Ct après amplification par PCR de cet échantillon sont ressorties comparables avec un Ct de 27,99 pour la manipulation 1, et un Ct de 25,57 pour la manipulation 3.

Ces résultats ont pu être validés devant l'absence de détection d'inhibiteur de PCR, et une PCR albumine positive dans chacun des échantillons.

Cette étape nous a permis de valider les modifications de protocole.

2. Etude prospective

a) Echantillons testés

Vingt-deux échantillons ont été reçus et analysés entre le 2 novembre 2018 et le 30 avril 2019 au CHU de Nantes.

Le délai moyen d'acheminement était d'environ 1,8 jours. Le délai moyen de rendu de résultat était quant à lui de 10 jours (détail en Annexe 2).

b) Comparaison des résultats

Concernant les résultats bruts de nos échantillons, le tableau I-2 présente les résultats de PCR *Toxoplasma* (résultats qualitatifs), PCR Albumine (résultats quantitatifs sous forme de Ct) et des inoculations à la souris.

Manip	Date		Echant	Diagnostic de TC	Résultat		
	Ext	PCR			PCR	Inoc	Ct Albu
4	9.11.18	12.11.18	1	Inconnu	-	-	15,65
			2	Négatif	-	-	15,95
5	14.11.18	16.11.18	3	Inconnu	-	-	14,81
			4	Négatif à J0	-	-	16,24
6	4.12.18	5.12.18	5	Négatif à M9	-	-	16,05
			6	Négatif	-	-	19,21
7	27.12.18	28.12.18	7	Négatif à J4	-	-	14,94
			8	Négatif à J4	-	-	14,88
			9	Négatif à J4	-	-	17,18
8	31.12.18	4.01.19	10	Négatif	-	-	17,3
			11	Négatif à M6	-	-	17,98
9	22.01.19	25.01.19	12	Négatif à M1	-	-	18,47
			13	Négatif à M5	-	-	16,89
			14	Inconnu	-	-	16,32
10	31.01.19	1.02.19	15	Négatif à M6	-	-	18,5
			16	POSITIF	-	-	17,67
11	20.02.19	20.02.19	17	Négatif à J0	-	IT	20,46
12	28.02.19	4.03.19	18	Négatif à J0	-	-	20,48
			19	Négatif à M4	-	-	17,82
13	3.04.19	4.04.19	20	Négatif à M4	-	-	18,79
			21	POSITIF	+	-	19,59
14	23.04.19	24.04.19	22	POSITIF	+	+	18,02

Tableau I-2 : Tableau comparatif des résultats PCR Toxoplasme, inoculation à la souris et PCR Albumine au cours de notre travail expérimental.

Légendes : Manip = Numéro de la manipulation d'extraction ; Ext = extraction ; Echant = Numéro d'échantillon ; TC = Toxoplasme congénitale ; Inoc = inoculation à la souris ; Ct = Cycle threshold ; Albu = Albumine ; IT = Impossibilité technique ; - = résultat négatif, + = résultat positif.

Parmi les 22 échantillons, 19 sont négatifs, à la fois en PCR et après inoculation à la souris. Un seul (échantillon 17) est négatif en PCR sans résultat associé pour l'inoculation, les 6 souris inoculées étant toutes mortes à 4 jours de l'inoculation. Deux échantillons sont positifs en PCR, l'un d'eux (échantillon 21) étant négatif après inoculation à la souris.

c) Validation d'un Ct seuil d'Albumine

La moyenne des Ct de l'albumine est de 17,42. Cette valeur de Ct « seuil » pourrait être utilisée comme « témoin interne » d'extraction.

D. Discussion

1. Mise au point du protocole

a) Protocole définitif choisi

L'analyse des échantillons 3 et 1, nous a permis de valider premièrement l'incubation au bain-marie sur la journée, puis secondairement l'incubation en bloc chauffant sur la journée.

En prenant en compte ces résultats, nous avons décidé de suivre le protocole comprenant une incubation dans la protéinase K sur la journée et en bloc chauffant pour l'ensemble des manipulations de notre étude. Effectivement, notre travail s'ajoutant à l'activité de routine du service, il a été décidé de laisser le bain-marie disponible pour la préparation des placentas en journée (celui ci nécessitant une température d'incubation différente). Le fait de pouvoir faire l'ensemble de la manipulation (extraction comprise) sur la journée, a permis d'optimiser le temps de manipulation personnel.

b) Fréquence de réalisation de la technique

Les échantillons de placentas reçus au cours de notre étude arrivaient de manière aléatoire. Le but de cette mise au point a été d'évaluer la fréquence « idéale » de cette technique au sein de l'activité de routine du laboratoire.

Nous avons pu remarquer des contraintes de temps incompressibles (l'incubation sur une longue durée avec la protéinase K) et des contraintes de matériels avec notamment la disponibilité de l'automate d'extraction Maxwell (Promega) partagé avec différents services. En prenant en compte ces contraintes, le nombre moyen de placentas reçus par semaine, et les demandes des services, nous en avons conclu qu'une fréquence d'extraction hebdomadaire serait suffisante.

c) Temps minimal d'incubation

Cette phase de mise au point nous a permis de valider un temps d'incubation minimal permettant une lecture valide des résultats de PCR. Au vu des différences négligeables de valeurs de Ct (Albumine ou Toxoplasmose) entre une incubation de 5h15 et une incubation de 7h, nous avons validé la nécessité d'une incubation d'au moins 5h15.

L'analyse des 10 autres échantillons (Annexe 3) a validé la bonne prise en main de la technique d'extraction par l'opérateur.

2. Etude prospective

a) Sur les échantillons testés

Concernant le délai moyen de rendu du résultat par rapport à la réception de l'échantillon (environ 10 jours) il faut tenir compte du contexte dans lequel cette étude a été menée. Etant une étude « de validation de méthode », les résultats de la technique de PCR n'ont jamais été communiqués aux prescripteurs, même en cas de positivité. Ainsi, étant donné l'absence de critères d'urgence de rendu du résultat, nous avons privilégié la manipulation des échantillons par une seule personne. Cela sous-entend qu'en son absence (congé) ou en l'absence de disponibilité de matériel, certains placentas n'ont pu être extraits que secondairement et donc avoir un résultat de PCR bien plus tardif qu'en routine.

De même dans ce travail, en cas d'absence de série d'amplification PCR Toxoplasmose prévue, nos prélèvements étaient reportés à la série suivante amenant parfois à des délais de rendu de résultats supérieurs à ceux que l'on pourrait trouver en routine.

Cela aboutit au fait que notre délai moyen de rendu de résultat est probablement surestimé par rapport à celui que l'on obtiendrait en conditions réelles.

b) Sur les résultats comparés

Les résultats de notre étude ont été portés sur 22 échantillons. Malgré un petit échantillonnage, des différences notables ont pu être mis en évidence.

Premièrement, aucun échantillon n'est sorti positif à l'inoculation et négatif en PCR.

Secondairement, tous les échantillons revenus positifs à l'inoculation sont aussi revenus positifs en PCR, ce qui semble montrer que la biologie moléculaire n'est pas « inférieure » à l'inoculation à la souris.

Les résultats les plus intéressants se trouvent dans les résultats des manipulations 11 et 13, traitant respectivement des échantillons 17 et 21.

L'échantillon de placenta 17 est revenu négatif en PCR, tandis qu'il n'a pas pu être analysé par la technique d'inoculation à la souris, suite au décès des 6 souris inoculées.

Cet échantillon provenait d'un placenta réceptionné 4 jours après la date de prélèvement. Le décès de l'ensemble des souris fait suspecter une pullulation bactérienne du placenta préparé et injecté aux souris. A l'issue de l'injection, les décès des souris par septicémie sont importants et minimisent donc la possibilité d'avoir des souris viables à 1 mois de l'inoculation pour établir leur statut sérologique. Malgré l'utilisation de plusieurs souris pour augmenter la sensibilité de la technique, il arrive de se retrouver dans une situation comme celle-ci, où rendre un résultat est impossible.

La PCR quant à elle, est une technique qui n'a pas été mis à défaut, étant donné qu'elle n'est pas dépendante du statut, septique ou non, du placenta et que nous n'avons pas détecté d'inhibiteurs de PCR. Il existe donc une réelle limite dans la technique d'inoculation en cas de délai d'acheminement trop long (évalué à plus de 5 jours), ou de conditions de prélèvements du placenta non adéquates

L'échantillon 21 quant à lui est revenu positif en PCR et négatif à l'inoculation. En effet, les 6 souris inoculées ont eu une sérologie négative après 1 mois d'observation. Aucun

doute n'a été présent lors de la lecture de ces sérologies. Il est envisageable que la négativité de l'inoculation ne soit due qu'à un manque de sensibilité de cette technique vs la PCR. Ces résultats semblent être en accord avec les données de la littérature qui montrent que la technique de biologie moléculaire par PCR est l'une des techniques les plus sensibles qui existe à l'heure actuelle (9,116,118).

c) Evaluation d'un Ct seuil PCR Albumine

Le tableau I-3 reporte dans la dernière colonne la valeur des Ct d'Albumine de chacun des placentas analysés au cours de notre étude prospective. La moyenne de ces derniers est de 17,42. Nous avons ainsi pu retenir une valeur seuil du Ct de la PCR Albumine à atteindre, afin de rendre un résultat interprétable. Cet objectif n'est pas restrictif, mais permet au biologiste interprétant les résultats de PCR Toxoplasme de confirmer que l'extraction a été suffisamment « efficace ».

E. Conclusion et perspective

Ce travail expérimental a été mené durant 6 mois, initialement prévu sur 1 an. Cette période a été écourtée du fait de l'arrêt définitif du codage à la NABM (Nomenclature des Actes de Biologie Médicale) de l'inoculation à la souris à partir de février 2019. Bien que l'échantillonnage n'ait pu être aussi important que nous l'aurions voulu, il a pu mettre en évidence certains points importants.

Avant tout, il nous a permis de valider un protocole d'extraction final, et utilisable en routine au sein de l'activité quotidienne du laboratoire. Ce protocole a été rendu flexible grâce à la validation d'un temps minimal d'incubation et de modalités d'incubation différentes, donc plus facilement réalisables en pratique quotidienne. Il a pu être testé auprès des techniciennes du laboratoire, dès fin avril 2019, et ce, sans complication. Aucun changement n'est à noter sur la prise en charge initiale des placentas reçus, préparés au fil des arrivées, comme déjà expliqué auparavant.

Il a aussi été décidé du rythme de fréquence de la technique d'extraction. Au vu de la nécessité d'un témoin d'extraction obligatoire pour chaque manipulation, ainsi que par souci de disponibilité de l'extracteur Maxwell, mutualisé avec d'autres services, le rythme d'une extraction par semaine a été retenu.

L'étude rétrospective menée par C. GUYONNAUD (2) et sa mise au point d'un premier protocole d'extraction a ainsi été confirmé par notre travail. Il nous a permis de valider définitivement cette nouvelle prise en charge des placentas en cas de séroconversion au cours de la grossesse, et d'abandonner définitivement la technique d'inoculation à la souris. Les résultats de l'analyse des placentas sont maintenant rendus en moins d'une semaine versus les 4 semaines obligatoires anciennement.

II. EVALUATION DE L'APPORT DIAGNOSTIQUE DU PROFIL IMMUNOLOGIQUE COMPARE IGM MERE/ENFANT PAR RAPPORT AU DOSAGE QUANTITATIF DES IGM PAR TECHNIQUE ISAGA EN PERIODE NEONATALE

A. Introduction

Comme déjà détaillé, le diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale (TC) fait appel à une association de différents tests. La TC ne sera affirmée qu'après la détection de *T. gondii* dans un liquide biologique du nouveau-né ou après la mise en évidence d'une réponse immunitaire de l'enfant dirigée contre *T. gondii*.

Ainsi, ce diagnostic sera posé en cas de détection du parasite (par PCR) :

- dans le liquide amniotique (le placenta n'affirme pas la toxoplasmose congénitale) en prénatal ou en néonatal
- dans le sang de cordon

Et/ou devant une réponse immunitaire spécifique de l'enfant, dirigée contre *T. gondii* :

- présence d'IgM ou IgA synthétisés par le nouveau-né à plus de 15 jours de vie
- positivité d'un profil immunologique comparé (PIC) mère/enfant IgG ou IgM : présence de bandes supplémentaires chez l'enfant, non retrouvées chez la maman, témoignant d'une néosynthèse d'anticorps par l'enfant
- mise en évidence d'une augmentation ou d'une stabilisation des taux en IgG
- présence d'IgG spécifiques à l'âge de 1 an

Dans ce but, au CHU de Nantes, les échantillons biologiques recommandés à la naissance d'un nouveau-né suspect de toxoplasmose congénitale sont les suivants :

1. Prélèvement du sang de cordon et du sérum du nouveau-né entre J0 et J3 de vie
2. Prélèvement du sérum maternel à l'accouchement
3. Prélèvement du placenta (le prélèvement de liquide amniotique à l'accouchement n'est actuellement pas réalisé en routine)

A partir de ces prélèvements, les examens nécessaires au diagnostic de la toxoplasmose congénitale sont réalisés :

- dosage des taux d'IgG par technique ELISA (Architect, Abbott et Vidas, Biomérieux), d'IgA par technique *Platelia* (Biorad) et d'ISAGA IgM (Biomérieux) sur le sang de cordon et le sérum J0-J3 du nouveau-né
- PIC mère/enfant IgG et IgM (LDBIO Diagnostics)
- analyse du placenta, sang de cordon et liquide amniotique par PCR (BioEvolution)

La recherche des IgM dans le diagnostic de toxoplasmose congénitale est primordiale car, contrairement aux IgG, cet isotype ne traverse pas la barrière placentaire, et sa présence dans le sérum du nouveau-né est anormale.

Actuellement, le dosage quantitatif des IgM par la technique ISAGA est systématiquement associé à un PIC IgM quel que soit le résultat ISAGA. Cependant cette prise en charge entraîne un coût non négligeable, et l'intérêt du PIC IgM par rapport au dosage des IgM par technique ISAGA est peu connu. Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer l'apport diagnostique du PIC IgM lorsque la recherche des IgM par

technique ISAGA est négative, afin d'optimiser l'utilisation de ces tests en période néonatale.

Pour répondre à cet objectif, nous avons comparé de manière rétrospective les résultats des dosages IgM par technique ISAGA *versus* les résultats des PIC IgM.

B. Matériels et méthodes

1. Population étudiée et données recueillies

Tous les PIC mère/enfant (IgG ou IgM) réalisés au sein du laboratoire de Parasitologie du CHU de Nantes, entre 2014 et 2019, ont été recueillis puis étudiés. Les dossiers d'intérêt pour notre étude devaient répondre aux trois conditions suivantes :

- ils devaient tout d'abord traiter d'un cas de séroconversion toxoplasmique prouvée au cours de la grossesse conduisant à une suspicion de toxoplasmose congénitale chez le nouveau-né
- il devait avoir été fait au minimum un PIC IgM
- enfin, nous devons avoir un indice ISAGA IgM établi soit précédemment, soit concomitamment au PIC

Pour chacun des dossiers, les données suivantes ont été recueillies :

- Le jour du prélèvement de sérum du nouveau-né ayant servi à établir le PIC
- L'indice ISAGA IgM
- Le résultat du PIC IgM
- L'absence ou la présence d'une toxoplasmose congénitale prouvée

Les données suivantes ont été associées, si celles ci étaient disponibles :

- Le résultat du PIC IgG
- Le résultat du PIC enfant-enfant IgG
- Le résultat du PIC enfant-enfant IgM

2. Interprétation de l'indice ISAGA IgM

La technique ISAGA (BioMérieux) est réalisée sur microplaque constituée de 12 barrettes de 8 puits à fond rond. Chaque sérum de nouveau-né est analysé dans 3 puits différents dans lesquels sont ajoutées des quantités croissantes d'antigènes toxoplasmiques (toxoplasmes entiers formolés).

La lecture de l'indice ISAGA IgM se fait à l'œil nu sur un fond blanc bien éclairé (Figure II-1).

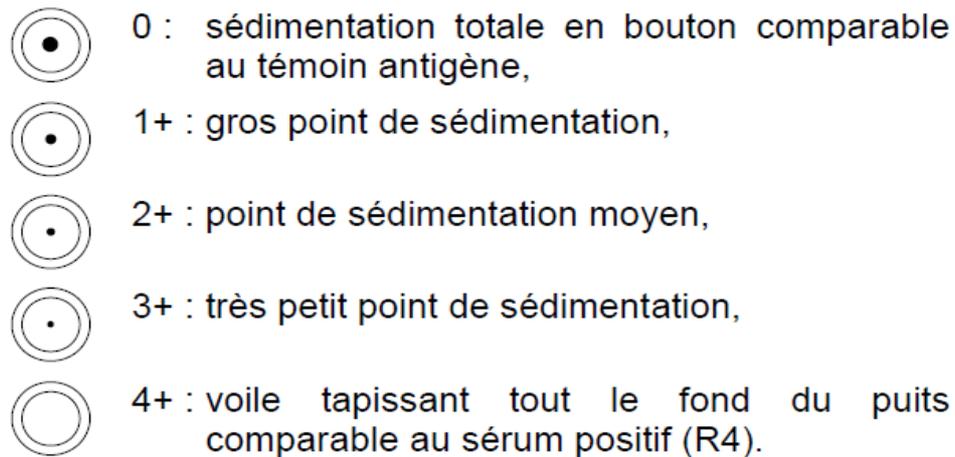


Figure II-1 : Interprétation et calcul de l'indice ISAGA selon la lecture visuelle des puits (notice Kit ISAGA IgM Biomérieux)

Une réaction positive est caractérisée par la fixation homogène des antigènes dans le puits donnant un aspect en voile. Il peut s'y associer une sédimentation plus ou moins importante en fond de puits correspondant à l'excès d'antigènes par rapports aux IgM spécifiques retenues. Un score de 0 à 4 est attribué à chaque puits en fonction de leur aspect.

L'indice ISAGA correspond à la somme des scores des trois puits analysant le sérum d'intérêt. Les indices ISAGA s'échelonnent donc de 0 à 12. Chez les enfants âgés de moins de 6 mois un indice supérieur ou égal à 3 est considéré comme positif.

3. Interprétation des PIC mère/enfant

Pour rappel, la lecture des PIC est une lecture visuelle. Une des limites rencontrées est l'intensité des bandes observées, ce qui rend parfois l'interprétation difficile, malgré une lecture conjointe par plusieurs biologistes.

Les différents PIC IgM ont été classés en 5 catégories :

(a) *PIC non réalisé*

La plupart du temps, ces PIC n'ont pas pu être faits par défaut de sérum de l'enfant (quantité insuffisante) ou de la mère à l'accouchement (sérum non prélevé ou non transmis)

(b) *PIC « négatif »*

Présence de bandes visibles (Figure II-2) correspondant au sérum maternel, mais absence de bande avec le sérum de l'enfant (bandelette blanche)

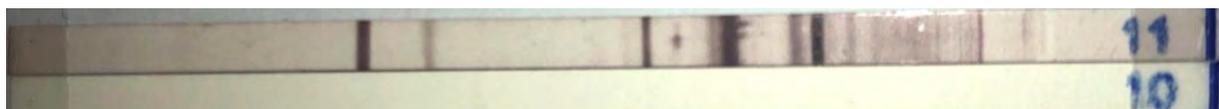


Figure II-2: Exemple d'un PIC négatif (n°11 : maman - n°10 : bébé)

(c) *PIC identique*

Présence de profils identiques en IgM chez la mère et chez l'enfant : les bandes observées chez l'enfant (Figure II-3) sont retrouvées chez la maman, correspondant à la révélation d'anticorps dirigés contre les mêmes épitopes.



Figure II-3 : Exemple de PIC identique (n°9 : maman - n°10 : bébé)

Ce cas de figure peut être retrouvé dans deux situations.

Le plus souvent, les IgM de l'enfant correspondent à des IgM maternels transmis au cours de l'accouchement. Ceux-ci peuvent être retrouvés dans le sérum du nouveau-né jusqu'à 10 jours de vie.

Plus rarement, ce profil peut correspondre à une néosynthèse d'anticorps par l'enfant, sans mise en évidence de nouvelle bande affirmant définitivement cette néosynthèse. Il est alors indispensable de renouveler les examens de façon rapprochée afin de ne pas méconnaître un diagnostic de toxoplasmose congénitale.

(d) *PIC positif*

Présence d'une (ou plusieurs) bande(s) supplémentaire(s) sur le profil de l'enfant (Figure II-4) par rapport au profil de la mère, témoignant d'une néosynthèse d'anticorps par l'enfant.



Figure II-4 : Exemple de PIC positif (n°13 : maman - n°12 : bébé) ;
Bande supplémentaire sur la bandelette du bébé (flèche) triplet caractéristique (cadre)

Ici, le diagnostic de toxoplasmose congénitale est affirmé.

(e) *PIC douteux*

Doute sur la présence d'une bande supplémentaire chez l'enfant en comparaison avec le profil de la mère (bande trop fine ou peu marquée, doute sur la présence d'une bande maternelle en regard).

Dans cette situation, le diagnostic final ne peut être posé. Il est primordial de renouveler ces examens de manière rapprochée, en y associant par exemple des PIC enfant-enfant.

C. Résultats

1. Caractéristiques des dossiers recueillis

Au total, 176 PIC IgG, associés ou non à un PIC IgM, ont été recueillis. Parmi ces 176 PIC, 160 avaient au moins un PIC IgM, et 16 n'ont pas pu être réalisés (quantité insuffisante de sérum pour la plupart). Des indices ISAGA étaient toujours associés à ces PIC.

Ces 176 PIC concernaient 154 patients différents. En effet, 8 patients ont eu 2 PIC avec indice ISAGA concomitant pour leur dossier, et 2 patients en ont eu 3. La majorité de ces cas relevaient de difficultés d'interprétation, nécessitant une étude plus approfondie de la réponse immunitaire du nouveau-né.

Parmi les 154 dossiers patients, 24 (soit 15,5%) traitaient d'une toxoplasmose congénitale avérée. Quarante vingt dix huit (56 %) prélèvements ont été faits entre J0 et J3, 66 (37 %) entre J4 et J10 et enfin 12 prélèvements (7 %) après le J10.

Une moyenne de 30 PIC par an ont été recueillis entre 2014 et 2019. En 2014, seulement 10 PIC ont été réalisés (Figure II-5).

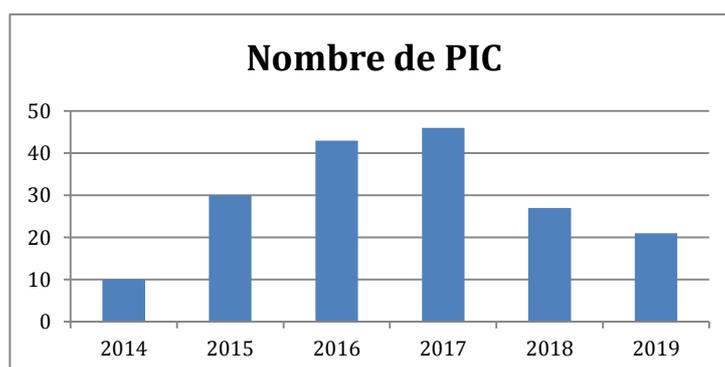


Figure II-5 : Nombre de PIC recueillis au CHU de Nantes de 2014 à novembre 2019

2. Comparaison des résultats obtenus par la technique ISAGA versus PIC

En partant des différentes interprétations des PIC vues précédemment, les résultats des 176 PIC ont été classés en 5 groupes différents : positif, identique, négatif, douteux, et non réalisé. Ces résultats sont présentés dans le tableau II-1 en fonction des indices ISAGA IgM qui sont associés à chaque profil comparé.

		Indice ISAGA négatif < 3	Indice ISAGA positif ≥ 3	Total
PIC mère/enfant IgM	Positif	1	15	16
	Identique	12	2	14
	Négatif	127	1	128
	Douteux	2	0	2
	Non réalisé	14	2	16
Total		156	20	176

Tableau II-1 : Résultats des PIC IgM en fonction des scores ISAGA IgM de notre population générale

Pour répondre à notre objectif, nous nous sommes focalisés sur les enfants ayant un indice ISAGA négatif, c'est à dire un indice strictement inférieur à 3. Les résultats des PIC IgM de cette population d'intérêt sont reportés dans le tableau suivant.

		Indice ISAGA = 0	Indice ISAGA = 1	Indice ISAGA = 2
PIC mère/enfant IgM	Positif	0	0	1
	Identique	12	0	0
	Négatif	127	0	0
	Douteux	2	0	0
	Non réalisable	14	0	0
Total		155	0	1

Tableau II-2 - Résultats des PIC IgM avec score ISAGA négatif

Parmi les 156 ISAGA négatifs, 155 avaient un résultat égal à 0, et 1 avait un résultat égal à 2. Le détail des dossiers « discordants » est présenté dans la partie suivante : indice ISAGA négatif avec PIC IgM positif, douteux ou identique.

3. Présentation des dossiers « discordants »

a) Indice ISAGA négatif avec PIC IgM positif

Ce cas est isolé et correspond au dossier de l'enfant 1.

- Histoire de l'infection toxoplasmique au cours de la grossesse :

Mère âgée de 25 ans.

Séroconversion post-conceptionnelle à environ 17 SA.

A 23 SA, une amniocentèse est réalisée et le liquide amniotique revient positif pour *T. gondii* par technique PCR. Ce résultat est confirmé par la méthode d'inoculation à la souris.

Le diagnostic de toxoplasmose congénitale est posé, mais nous n'avons pas de notion d'une mise en route d'un traitement secondairement.

- Résultats sérologiques en période néonatale :

Les résultats des analyses biologiques faites chez le nouveau-né 1 ainsi que le PIC mère/enfant IgM et enfant/enfant IgM, sont reportés dans le tableau II-3 et la figure II-6.

	J0	J1	J14	J32
IgG Architect (UI/mL)	Hémolysé	138,5 (+)	94,2 (+)	61,7 (+)
IgG Vidas (UI /mL)	Hémolysé	106 (+)	116 (+)	75 (+)
IgM ISAGA (indice)	1	2	0	0
IgA Platelia (index)	0,31	0,33	0,42	0,29
PIC IgG		Identique		
PIC IgM		POSITIF		

Tableau II-3 : Résultats biologiques de l'enfant 1, de sa naissance (J0) à son 32^{ème} jour de vie (+) résultat positif

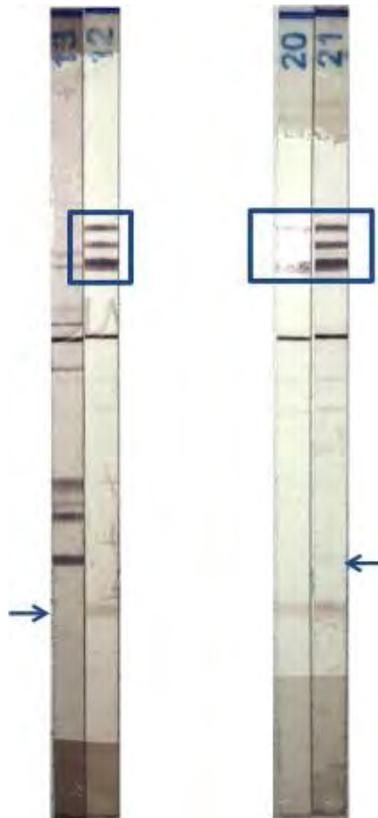


Figure II-6 : PIC du dossier de l'enfant 1 :
A gauche : PIC IgM mère n°13/enfant n°12 de l'enfant 1,
A droite : PIC IgM de l'enfant 1 à J1 (n°20) et J14 (n°21) ;
Les 2 cadres mettent en évidence un triplet antigénique caractéristique et les flèches
montrent en regard les bandes supplémentaires.

Le PIC IgM entre le sérum de la mère à l'accouchement et le sérum de l'enfant à J1, met en évidence la présence de 3 bandes supplémentaires (réparties en un triplet caractéristique) (159) associées à une autre bande supplémentaire sur la bandelette de l'enfant, par rapport à celle de la maman.

Le PIC IgM entre le sérum de l'enfant à J1 avec le sérum à J14, confirme les premiers résultats. On y retrouve le triplet caractéristique, mais aussi l'apparition d'une nouvelle bande à J14, inexistante dans le sérum du J1.

b) Indice ISAGA négatif avec PIC IgM douteux

Il existe deux dossiers présentant cette situation.

(1) Enfant 2

- Histoire de l'infection toxoplasmique au cours de la grossesse :
 Mère âgée de 33 ans.
 Séroconversion maternelle post conceptionnelle à environ 6-8 SA.
 Amniocentèse pratiquée à 19 SA, dont la PCR du liquide amniotique est revenue négative. Absence d'inoculation à la souris de liquide amniotique.

- Résultats sérologiques en période néonatale :

Les résultats des analyses biologiques faites chez le nouveau-né 2 ainsi que les deux PIC IgM, sont reportés dans le tableau II-4 et la figure II-7 suivante.

	J0	J3	J18	M3	M6
IgG Architect (UI/mL)	50,9 (+)	43,6 (+)	23,5 (+)	9,2 (+)	3 (+)
IgG Vidas (UI /mL)	77 (+)	64 (+)	34 (+)	10 (+)	1 (-)
ISAGA IgM (indice)	0	0	0	0	0
IgA Platelia (index)	0,54	0,33	0,24	0,39	0,39
PIC IgG		Identique	Identique		
PIC IgM		DOUTEUX	DOUTEUX		

Tableau II-4 : Résultats biologiques de l'enfant 3, de sa naissance (J0) à son 6^{ème} mois de vie (M6)
(+) résultat positif ; (-) résultat négatif

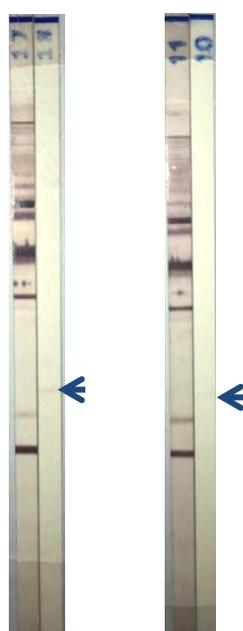


Figure II-7 : PIC mère/enfant IgM de l'enfant 2 à J3 de vie (n°17 : maman - n°18 : bébé)
et à J18 de vie (n°11 : maman - n°10 : bébé)
Les flèches montrent les bandes supplémentaires/suspectes dans le sérum de l'enfant.

Les scores ISAGA de l'enfant se sont maintenus négatifs et égaux à 0 dès la naissance. Deux PIC IgM ont été faits à partir du sérum de la mère à l'accouchement, et avec respectivement les sérums de l'enfant à J3 et à J18. La lecture du premier PIC montre un doute sur la présence d'une bande supplémentaire chez l'enfant par rapport à la mère. On retrouve cette même bande sur le deuxième PIC, mais avec cette fois ci la détection d'une très fine bande en regard dans le sérum de la mère.

(2) *Enfant 3*

- Histoire de l'infection toxoplasmique au cours de la grossesse :

Mère âgée de 30 ans.

Séroconversion post conceptionnelle entre 5 et 10 SA.

Amniocentèse à 18 SA dont le liquide amniotique est revenu négatif à la fois en PCR et après inoculation à la souris.

- Résultats sérologiques en période néonatale :

Les résultats des analyses biologiques faites chez le nouveau-né 3 ainsi que le PIC mère/enfant IgM sont reportés dans le tableau II-5 et la figure II-8 suivante.

	J0	J4	M3	M6	M9	M12
IgG Architect (UI/mL)	62 (+)	58,9 (+)	6,2 (+)	1,3 (-)	0,3 (-)	0,5 (-)
IgG Vidas (UI /mL)	98 (+)	70 (+)	9 (+)	0	0	0
IgM ISAGA (indice)	0	0	0	0	0	0
IgA Platelia (index)	0,21	0,12	0,20	0,19	0,33	0,22
PIC IgG		Identique				
PIC IgM		DOUTEUX				

Tableau II-5 Résultats biologiques de l'enfant 3, de sa naissance (J0) à son 12^{ème} mois de vie (M12)
(+) résultat positif (-) résultat négatif



Figure II-8 : PIC mère/enfant IgM de l'enfant 3 à J4 de vie (n°19 : maman - n°18 : bébé)
la flèche montre la présence possible d'une bande sur la bandelette de l'enfant

Le PIC IgM entre le sérum à l'accouchement de la maman et le sérum du nouveau-né à J4 ne permet pas de trancher sur la présence ou l'absence d'une bande supplémentaire dans le sérum de l'enfant.

4. Indice ISAGA négatif avec PIC identique

Cette situation se retrouve dans 12 dossiers. Les différents PIC mère/enfant sont présentés dans l'Annexe 4. Le nombre de bandes présentes sur les bandelettes du bébé varie entre 1 et 6. Toutes ces bandes sont systématiquement retrouvées sur les bandelettes maternelles associées.

D. Discussion

1. A propos de notre population générale

Nous avons recueilli 176 PIC entre 2014 et 2019, parmi lesquels 160 étaient des PIC IgM. Avant 2014, les PIC n'étaient pas réalisés de façon systématique et donc n'ont pas

été inclus dans l'étude rétrospective. Cet échantillonnage nous semble suffisamment conséquent afin de répondre au mieux à notre question principale.

Parmi les PIC étudiés, 15,5% traitaient d'un dossier de toxoplasmose congénitale avérée. Ce pourcentage ne porte en fait que sur une partie de l'ensemble des cas de séroconversions toxoplasmiques en cours de grossesse. Effectivement, nous n'avons pas recueilli l'ensemble des dossiers de SC maternelles, mais seulement ceux associés à la réalisation d'un PIC. Les dossiers pour lesquels aucun PIC (IgG et IgM) n'étaient réalisés correspondent à des dossiers où le sérum maternel n'a pas été prélevé au moment de l'accouchement.

On a pu remarquer que le nombre de PIC est resté globalement stable entre 2015 et 2019 (Figure II-5). L'année 2014 ne comptait que 10 PIC, mais cette année correspondait à la mise en place de la réalisation des PIC systématiques. On peut donc évaluer une activité à environ 30 PIC par an.

L'absence de déclaration obligatoire des SC toxoplasmiques en cours de grossesse et la grande étendue de recrutement du laboratoire du CHU de Nantes (centre d'expertise pour les séroconversions s'étendant de la Bretagne aux Deux-Sèvres), ne nous permet pas de comparer la stabilité globale du nombre de PIC réalisés par an avec le nombre de cas de séroconversions.

Cependant, au fil des dernières années, les soignants sont de plus en plus attentifs à l'envoi de l'ensemble des prélèvements nécessaires au diagnostic de TC en période néonatale, même s'il reste un nombre important de profils comparés non réalisés. Le dialogue clinico-biologique peut ainsi être en partie responsable du nombre non négligeable de PIC réalisés. L'amélioration des outils d'informations permettrait toutefois de limiter le nombre de PIC non réalisés en raison de l'absence de sérum à l'accouchement.

2. A propos de notre population d'intérêt ISAGA négatif

Le test ISAGA IgM est reconnu comme le test le plus sensible par rapport à l'ELISA ou l'IFI pour la détection des IgM dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (74). C'est d'ailleurs celui qui est le plus utilisé pour confirmer la présence des IgM anti-*Toxoplasma* (1) en néonatal. Chez les nouveau-nés de mère non traitées, la recherche des IgM en ISAGA présente une sensibilité de 87% (160). La sensibilité est plus élevée en cas de séroconversion tardive et en absence traitement préventif de la transmission materno-fœtale ou de traitement in utero de la toxoplasmose congénitale. Ainsi, en France, la sensibilité de la détection des IgM par la méthode ISAGA ne dépasserait pas les 70% (9).

L'étude des ISAGA négatifs en comparaison au PIC IgM nous a permis de mettre en évidence des points essentiels.

- Plus de 80% des ISAGA négatifs (indice <3) sont associés à un PIC négatif (127/156).
- Aucun PIC IgM n'a été retrouvé positif pour les 155 dossiers avec indice ISAGA égal à 0.

Il semble donc exister une bonne corrélation entre l'ISAGA et le PIC en cas de négativité de l'ISAGA. Cette situation est la plus fréquemment observée. Les données de la littérature montrent que la sensibilité de ces deux techniques réalisées entre J0 et J10, bien qu'imparfaite, est similaire (ISAGA IgM J0-J10 : 67,5% *versus* PIC IgM J0-J10 : 56,7%) (161).

Dans notre population, il existe cependant 29 autres cas d'ISAGA négatifs dont les PIC IgM n'étaient pas négatifs. Pour répondre à notre objectif principal, nous allons discuter de ces différentes situations « discordantes ».

3. A propos des cas « discordants »

a) Indice ISAGA négatif avec PIC IgM positif

Dans ce dossier, le diagnostic de toxoplasmose congénitale a été posé en période anténatale après amniocentèse. Il a probablement conduit à une mise en route rapide d'un traitement par la bithérapie PS (données non disponibles pour ce dossier). Or, des études ont montré que le traitement par PS semble réduire la probabilité d'avoir une sérologie positive en néonatal et donc de conclure au diagnostic de TC (9,49,161). Malgré cela, les PIC mère/enfant puis enfant/enfant réalisés ici montrent incontestablement la néosynthèse d'IgM par l'enfant, et la diversification de ces IgM. Ils affirment donc le diagnostic de toxoplasmose congénitale, et ce, malgré un test ISAGA négatif, coté à 2.

Dans la littérature, quelques cas de PIC positifs avec indice ISAGA négatif sont rapportés à la naissance : l'équipe de Rilling et collègues rapportent 6 enfants atteints de TC avec un indice ISAGA négatif (indice non précisé) mais un PIC IgG ou IgG et IgM positifs ; aucun PIC IgM positif isolé n'était rapporté (162). Tissot, Dupont et collègues, rapportent un cas de TC (parmi les 23 étudiés) avec indice ISAGA négatif et PIC positif IgG et IgM à la naissance (163). Enfin Magi & Migliorini rapportent un cas sur 56 couples mère/enfant d'indice ISAGA négatif (indice non précisé) avec PIC positif (sans précision sur l'isotype IgG ou IgM) (164).

b) Indice ISAGA négatif avec PIC douteux

Dans notre étude 2 dossiers présentaient des PIC douteux avec un indice ISAGA négatif. Le doute sur la présence d'une bande supplémentaire sur le PIC, nous a fait évoquer une possible néosynthèse d'IgM par l'enfant.

Ces dossiers ont nécessité de répéter la réalisation des PIC mère/enfant puis enfant/enfant, et d'évaluer la cinétique des anticorps avant de pouvoir conclure. Ce suivi rapproché nous a permis, dans les deux situations, d'être rassurés devant la diminution progressive des taux d'IgG sans apparition d'IgM ou d'IgA.

Pour l'enfant 2, la bande « douteuse », bien que persistante à J18, semble finalement correspondre à une bande maternelle, non détectée sur le précédent PIC. Même si le suivi sérologique a été stoppé à l'âge de 6 mois, la franche diminution des taux en IgG dans la suite du suivi de cet enfant est en faveur d'une absence de toxoplasmose congénitale.

Pour l'enfant 3, nous n'avons pas reçu de nouveau sérum avant les 3 mois de l'enfant. A cet âge-ci, les taux d'IgM et IgG détectés avaient fortement diminués. La sérologie strictement négative à l'âge de 1 an a permis d'exclure définitivement le diagnostic de toxoplasmose congénitale chez cet enfant.

Pour ces deux dossiers, le doute de lecture du PIC IgM à J3/J4 de vie témoignerait donc probablement de la présence d'IgM maternelles transmises lors de l'accouchement, non détectées sur la bandelette maternelle.

c) Indice ISAGA négatif avec PIC identique

Nous avons recueilli 12 dossiers répondant à ces critères. Aucun d'eux n'a conclu secondairement à une TC. Nous pouvons donc en conclure que les bandes visibles sur les bandelettes des nouveau-nés, et identiques à celles de la mère, relevaient bien d'une transmission d'IgM maternelles pendant l'accouchement. Cette situation reste néanmoins rare, et ne concerne que 12 dossiers sur les 156 dossiers avec ISAGA négatifs. Le suivi sérologique de ces enfants a permis d'éliminer le diagnostic de TC.

La négativité de l'ISAGA (indice égal à 0) alors que des bandes correspondant à des anticorps dirigés contre des antigènes de *T. gondii* sont visibles, pose question. Potasman et collègues rapportent la même observation à partir d'immunoblot « maison » (165). Quelques ISAGA négatifs avec indice égal à 0 étaient associés à la présence de bandes de faible intensité. Si le sérum maternel était disponible, la ou les bande(s) étaient aussi présente(s) chez la maman. L'hypothèse émise par cette équipe est que les antigènes détectés sont différents entre l'ISAGA et l'immunoblot.

De nombreuses publications (166) ont d'ailleurs fait état de bandes révélées par immunoblot chez des personnes n'ayant jamais été infectées par *T. gondii*. Ces anticorps (IgG et IgM) sont très fréquemment révélés par immunoblot. Ils seraient dus à des réactions croisées avec des anticorps dirigés contre des immunogènes de nature encore non déterminée. Chez les nouveau-nés, les anticorps naturels (autres que des anticorps maternels transmis) ne sont pas ou peu présents et ne perturbent donc pas les PIC. Mais la probabilité d'apparition de ces anticorps augmente avec l'âge du nourrisson (167). C'est donc pour éviter tout faux positif que l'indication du PIC IgM dans le suivi postnatal est limitée à 3 mois en IgG et à 1 mois en IgM, selon les recommandations du fabricant.

d) Indice ISAGA négatif avec PIC non réalisé

Nous avons comptabilisé 14 profils comparés non réalisées avec indice ISAGA négatifs. Ces 14 cas concernaient 10 patients (certains patients ayant plusieurs PIC chacun) et ils avaient tous un indice ISAGA égal à 0. Une quantité insuffisante de sérum du nouveau-né ou une absence de prélèvement de sang maternel à l'accouchement étaient très majoritairement à l'origine de l'absence de PIC IgM.

Au final, 5 toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiquées parmi ces 10 dossiers cliniques.

Ces 5 TC ont été diagnostiquées systématiquement en anténatal. Dans un contexte comme celui-ci, le PIC peut sembler moins « indispensable » à la prise en charge que lors de l'étude d'un sérum de nouveau-né dont les examens anténataux étaient négatifs ou

non réalisés. Effectivement, la prise en charge n'aurait pas été différente en raison du diagnostic déjà connu de TC. Nous pouvons donc imaginer que l'absence de sérum suffisant pour pratiquer les PIC IgM n'a donc pas été une raison suffisante pour en prélever un secondairement.

Parmi les 5 autres dossiers, 2 avaient un LA négatif et 3 n'ont pas eu d'amniocentèse. Dans ces cas de figure, les prélèvements néonataux étaient fortement recommandés afin de mettre en œuvre l'ensemble des techniques disponibles pour diagnostiquer rapidement une éventuelle TC. Certains de ces sérums « manquants » auraient effectivement pu conduire à un diagnostic de TC.

Il est donc primordial de transmettre aux cliniciens l'importance de ces prélèvements en néonatal, afin d'éviter toute impossibilité technique.

E. Conclusion et perspectives

L'étude de notre recueil a permis de répondre à plusieurs questions, dont la principale : peut-on s'abstenir de réaliser un PIC IgM en cas d'indice ISAGA négatif chez les nouveau-nés issus d'une grossesse au cours de laquelle une séroconversion toxoplasmique a été mise en évidence ?

Sur les 176 profils comparés recueillis, il n'y a qu'un seul indice ISAGA négatif avec un PIC IgM positif. Dans ce dossier, l'indice ISAGA négatif est égal à 2 et le diagnostic de toxoplasmose congénitale avait été posé en période anténatale.

La prise en charge actuelle (1) prévoit de faire un PIC IgM pour tout dossier de suspicion de toxoplasmose congénitale, quelque soit l'indice ISAGA. L'étude de l'ensemble des PIC faits de 2014 à 2019 nous permet de proposer une prise en charge optimisée. Au vu de nos résultats, nous pourrions imaginer l'indication d'un profil comparé mère/enfant IgM seulement en cas de score ISAGA strictement supérieur à 0. Cette décision repose clairement sur le fait qu'aucun ISAGA avec indice égal à 0 n'a eu de PIC positif, même en cas de doute initial sur le premier profil comparé (cas des ISAGA négatif avec profil comparé douteux). En cas de traitement par PS, le PIC doit être réalisé, quelque soit le résultat de l'ISAGA.

L'arrêt de la prise en charge actuelle aurait plusieurs conséquences. L'analyse par Immunoblot a été incluse en février 2019 dans la nomenclature alors qu'elle était auparavant hors nomenclature. Son codage (B320) correspond à un coût évalué à environ 85 euros pour un blot alors que la recherche d'IgM ISAGA, couplé à la recherche des IgG est coté B40 (environ 11 €). Ce changement de prise en charge optimiserait ainsi le coût diagnostic, mais également le temps passé à réaliser la technique.

Cette proposition est à évaluer au cas par cas avec le biologiste référent. En effet, les dernières publications, référencées par Robert Gangneux et al en 2017 (9) estiment que la combinaison des PIC avec l'ISAGA IgM améliore la sensibilité diagnostique (162) d'autant plus si elle est associée au suivi sérologique néonatal et à la recherche anténatale (sensibilité évaluée à 96%).

Notre étude a cependant présenté des limites. Nous n'avons en effet pas pu recueillir les données (présence ou non d'un PIC) de tous les dossiers traitant de séroconversions maternelles en cours de grossesse. Nous aurions pu voir que la grande majorité n'avait pas de PIC réalisé, par défaut de sérum maternel à l'accouchement. Une attention particulière est donc mise sur le dialogue clinico-biologique avec les préleveurs et prescripteurs de la maternité, pour éviter ces PIC non réalisés.

Il aurait aussi pu être intéressant de recueillir les données en lien avec l'ensemble des traitements reçus par les mères en cours de leur grossesse. La littérature (9) et certains de nos dossiers ont pu mettre en évidence un possible rôle d'un traitement préventif ou curatif en cours de grossesse sur les résultats néonataux. Ces résultats restent à interpréter au cas par cas, et avec prudence en cas de résultat d'ISAGA non strictement égal à 0.

III. ELABORATION D'UNE PLAQUETTE EXPLICATIVE ET COMMUNICATION AUPRES DES SERVICES CLINIQUES

Les résultats de nos deux travaux, à la fois sur l'étude des placentas en néonatal et l'étude des sérums des nouveau-nés par profils comparés mère/enfant IgM à la naissance et dans leur suivi, ont mis l'accent sur le manque d'information de l'équipe soignante. Effectivement, le manque important de sérum maternel à l'accouchement, ou bien les longs délais d'acheminement des placentas témoignent des difficultés de communication probable avec les services cliniques. Il existe donc un réel besoin de dialogue clinico-biologique.

C'est dans ce but que nous avons réalisé une plaquette explicative, récapitulant les changements de prise en charge opérés à partir du 1^{er} mai 2019, dans un contexte de suspicion de toxoplasmose congénitale chez le nouveau-né. L'accent a été mis en premier sur les conditions de prélèvement puis de prise en charge du placenta et du sang de cordon à la naissance. Y a été ajouté celle du liquide amniotique. Nous en avons profité pour rappeler l'importance des profils comparés mère/enfant à la naissance, en cas de séroconversion maternelle en cours de grossesse, et la nécessité d'avoir un prélèvement de sang maternel à l'accouchement dans ce contexte.

Cette plaquette a déjà fait l'objet d'une communication auprès des cliniciens obstétriciens. Elle va être intégrée dans le manuel de prélèvement informatisé du CHU de Nantes, et sera ainsi disponible auprès des biologistes comme des cliniciens, de l'hôpital ou des établissements extérieurs.

TOXOPLASMOSE CONGENITALE : NOUVEAUTES

Depuis le 1^{er} mai 2019, le laboratoire de Parasitologie du CHU de Nantes change ses procédures dans le **diagnostic de Toxoplasmose Congénitale**.

Aussi, nous vous informons des modifications dans cette plaquette explicative.

Le diagnostic de Toxoplasmose Congénitale s'adresse aux patientes ayant fait une séroconversion toxoplasmose au cours de leur grossesse ou juste avant.

Son diagnostic repose sur :

- En période anténatale
 - L'étude du **liquide amniotique**
- A l'accouchement :
 - L'étude du **sang de cordon**
 - L'étude du **placenta**
- En période néonatale :
 - Le **suivi sérologique** régulier du bébé jusqu'à 1 an

Suite aux recommandations de l'HAS (1) et au changement de nomenclature (2), **les techniques d'analyse des prélèvements évoluent**.

(1) Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire, recommandation HAS, février 2017

(2) Journal officiel de la République Française, Texte 18 sur 128, Janvier 2019



LIQUIDE AMNIOTIQUE

AVANT	DEPUIS LE 1/05/2019
2 flacons stériles avec 10 mL de liquide amniotique chacun	1 flacon stérile avec 15 mL de liquide amniotique
Diagnostic biologique par : - PCR <i>et</i> - <i>Inoculation à la souris</i>	Diagnostic biologique par : - PCR uniquement
	Le liquide amniotique doit OBLIGATOIREMENT être accompagné du consentement de la patiente et des bilans sérologiques antérieurs (s'ils n'ont pas été réalisés au CHU)



PLACENTA

AVANT	DEPUIS LE 1/05/2019
Recueil du placenta entier non formolé (au minimum 200 g)	Recueil du placenta entier non formolé (au minimum 200 g)
Acheminement rapide dans un contenant adapté, à +4°C	Acheminement rapide dans un contenant adapté, à +4°C
Diagnostic biologique par : - <i>Inoculation à la souris</i> - Résultat en <i>4 semaines</i>	Diagnostic biologique par : - PCR - Résultat en 10 jours



SANG DE CORDON

AVANT	DEPUIS LE 1/05/2019
Prélèvement du sang de cordon sur : - tube sec (bouchon jaune ou rouge)	Prélèvement du sang de cordon sur : - tube sec (bouchon jaune ou rouge) ET - tube avec EDTA (bouchon violet)
Diagnostic biologique par : - Sérologie - <i>Inoculation à la souris</i>	Diagnostic biologique par : - Sérologie et - PCR
	Toujours associer : un prélèvement de sérum maternel prélevé le jour de l'accouchement pour réalisation des profils comparés IgG et IgM mère/enfant



CONCLUSION

Le diagnostic de toxoplasmose congénitale en période néonatale repose sur un faisceau d'arguments, au centre duquel se trouvent les analyses biologiques.

La mise en évidence du parasite *Toxoplasma gondii* au sein du placenta, est l'un des maillons de cette chaîne diagnostique. Depuis l'avènement de la PCR en temps réel, l'inoculation à la souris du placenta est devenue une technique obsolète. Après la mise au point d'un protocole d'extraction valide, nous avons mené un travail prospectif de 6 mois qui a permis d'abandonner définitivement l'analyse du placenta par inoculation à la souris, au profit de l'analyse du placenta par PCR en temps réel.

La réponse immunitaire de l'enfant est aussi un argument fondamental à l'affirmation du diagnostic de toxoplasmose congénitale. Dès sa naissance et jusqu'à ses 1 an, le suivi immunologique du nouveau-né est obligatoire. L'étude des profils immunologiques comparés mère/enfant IgM est actuellement systématiquement pratiquée en cas d'indice ISAGA IgM négatif. Après un recueil rétrospectif de 2014 à 2019, ce travail propose de maintenir les indications du profil comparé mère/enfant IgM seulement en cas d'indice ISAGA différent de 0.

Ces deux avancées biologiques ont permis d'optimiser la prise en charge du diagnostic de toxoplasmose congénitale en période néonatale au CHU de Nantes. Une bonne communication avec les services cliniques permettrait de perfectionner cette prise en charge, ce pourquoi nous avons mis en place une plaquette explicative permettant de résumer ces différents changements.

Bien que difficile à mettre en place, la recherche du parasite au sein du liquide amniotique à l'accouchement permettrait de compléter ce travail, et serait une avancée majeure pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale en période néonatale.

Annexe 1 : Résultats PCR *Toxoplasma* vs Inoculation à la souris durant l'étape de mise au point de l'opérateur

Manip	Echant	Date	Protocole	Incub	PCR	Ct	Inoc
0	3A	18.05	Incubation au bain-marie sur la nuit	8h	+	27,07	+
1	1A	29.09	Incubation au bain-marie sur la journée	5h15	+	27,99	+
	2	28.09			-	0	-
	3B	18.05			+	25,2	+
2	4	16.09	Incubation en bloc chauffant sur la journée (1)	6h30	-	0	-
	5	25.09			-	0	-
	6	27.09			-	0	-
3	1B	29.09	Incubation en bloc chauffant sur la journée (2)	7h	-	25,57	+
	7	16.10			+	0	-
	8	22.10			-	0	-
	9	23.10			-	0	-
	10	26.10			-	0	-
	11	27.10			-	0	-
	12	27.10			-	0	-

Légende : Manip = numéro de la manipulation ; Echant = Numéro d'échantillon ; Date = Date du prélèvement ; Incub = Temps d'incubation ; PCR = Résultat de la PCR *Toxoplasma* ; Ct = Cycle threshold ; Inoc = Résultat de l'inoculation ;
Signe - = résultat négatif ; signe + = résultat positif

Annexe 2 : Informations sur les échantillons de notre travail expérimental

Echantillon	Délai entre le prélèvement et la réception (en jours)	Délai entre la réception et le rendu du résultat (en jours)
1	0	6
2	2	5
3	1	4
4	2	4
5	5	4
6	0	17
7	0	16
8	2	15
9	0	8
10	1	7
11	3	7
12	4	23
13	1	23
14	1	21
15	1	10
16	1	9
17	4	14
18	1	12
19	0	6
20	6	21
21	0	3
22	5	9
Moyenne	1,8	10

Annexe 3 : Mode opératoire final de la préparation des placentas

	MODE OPERATOIRE TOXO - Préparation des placentas	Diffusion par : PHU 07 - Biologie - PARASITOLOGI E	9130-MO-003
	Processus : *Métier Biologie\Analytique\Réalisation de l'analyse et validation technique	Page 1 / 5	V. 02

1. OBJECTIFS

Préparation du placenta en vue d'une PCR *Toxoplasma gondii* dans l'aide au diagnostic de toxoplasmose congénitale.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Le(s) secteur(s) concerné(s) est (sont) :

Laboratoire de parasitologie/Secteur morphologie
Ce document s'adresse aux techniciens de laboratoire habilités.

3. PREPARATION DES PLACENTAS

3.1 REACTIFS

- Trypsine à 2,5% (fournisseur selon le marché en cours) :
 - Aliquotée par le personnel de la préparation des milieux
 - Conservée à -20°C
- Solution d'antibiotiques : Pénicilline (10 000 U/mL) / Streptomycine (10 000 µg/mL)
 - Préparée et aliquotée (2 mL) par le personnel de la préparation des milieux
 - Conservée à -20°C
- Liquide de Hanks (fournisseur selon le marché en cours) :
 - Flacon de 1L, prêt à l'emploi
 - Conservé à température ambiante avant ouverture et à +4°C après ouverture

3.2 MATERIEL NECESSAIRE

- Matériel stérile :
 - un plateau,
 - deux erlenmeyers de 500mL,
 - une paire de ciseaux,
 - une pince,
 - un bécher,
 - un bol à broyer,
 - un tamis
 - deux pots à centrifuger.
- Une balance
- Un bidon DASRI : liquide solidifié
- Un broyeur.

REDACTEUR(S)	VERIFICATEUR(S)	APPROBATEUR(S)	Date d'application
Christine BUREAU (Technicien de laboratoire - PHU 07 - Biologie\Parasitologie), Claire GAUDY (Interne - PHU 07 - Biologie)	Fakhri JEDDI (Responsable qualité - PHU 07 - Biologie\Parasitologie), Rose-Anne LAVERGNE (Biologiste - PHU 07 - Biologie\Parasitologie)	Patrice LE PAPE (Biologiste - PHU 07 - Biologie\Parasitologie)	23/09/2019

3.3 MODE OPERATOIRE

1. Tarer un erlenmeyer.
2. Sous le PSM, déposer le placenta dans le plateau stérile.
3. Le découper afin d'en prélever 100 g dans divers endroits
4. Noter le poids si la quantité est inférieure à 100 g. Les quantités de réactifs ou de solution de lavage seront réduites proportionnellement.
5. Dans l'erlenmeyer, procéder à 3 lavages successifs avec du liquide de Hanks : ajouter 1/3 de litre dans l'erlenmeyer, agiter manuellement et éliminer le liquide dans un bidon DASRI. Répéter cette opération 2 fois.
6. Mettre le placenta lavé dans un bol à broyer.
7. Broyer jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène : à grande vitesse (HI), broyer 3 fois une minute.
8. En cas de quantité insuffisante pour permettre le broyage, quelques millilitres de trypsine peuvent être ajoutés.
9. Ajouter 20 mL de trypsine et 180 mL de liquide de Hanks puis transvaser dans le deuxième erlenmeyer (concentration finale en trypsine 2,5 µg/mL).
10. Ajouter 2 mL du mélange d'antibiotiques.
11. Incuber au moins 2 h dans un bain-marie à 37°C sous agitation (180-200 agitations/minute), erlenmeyer bouché avec du parafilm.
12. L'incubation terminée, passer la préparation au tamis pour défibriner et récupérer le filtrat dans un bécher.
13. Verser le contenu dans deux pots à centrifuger (de manière équilibrée).
14. Centrifuger à 4°C à 3250 tr/min pendant 20 minutes.
15. Récupérer le culot (la trypsine est éliminée) et le laver à l'eau physiologique stérile (en ajoutant le volume maximum du pot à centrifuger).
16. Centrifugation 20 minutes à 3250 tr/min.
17. Répéter les opérations 13 et 14 deux à trois fois, jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
18. Réunir les deux culots, mélanger.
19. Aliquoter 2 tubes sérothèques avec 1 mL de placenta préparé et congeler à -20°C.
20. Conserver le reste du culot à 4°C jusqu'au résultat de la PCR (en cas de positivité, l'échantillon est transmis au CHU de Rennes pour inoculation à la souris).

Après trempage dans un détergent type « SALVANIOS », la vaisselle utilisée est déposée sous l'évier (les agents de la laverie s'occupent de la stérilisation du matériel).

4. PREPARATION DE L'EXTRACTION

4.1 REACTIFS

- Kit Extraction RSC Blood DNA (Promega)
- Tampon de lyse CLD (Promega)

4.2 MATERIEL NECESSAIRE

- Bain marie avec agitation
- Tubes type Falcon 15 mL
- Tubes type sérothèque de 2 mL
- Billes de verre stériles (diam 3 mm)
- Pipette de 100-1000 µL

- Pipette de 5-50 µL
- Anse stérile de 10 µL
- Vortex

4.3 MODE OPERATOIRE

1. Allumer le bain marie à 56°C.
2. Sortir les échantillons de placentas trypsinés situés dans le congélateur. Les mettre à décongeler dans le bain marie, le temps que celui-ci atteigne 56°C.
3. Identifier les tubes Falcon 15 ml par le numéro de demande (sur le tube et le bouchon) :
 - 1 tube pour le contrôle d'extraction
 - 1 tube par échantillon de placenta
4. Sous PSM propre, ajouter successivement dans chacun des tubes Falcon identifié :
 - l'équivalent de 1 mL de billes de verre stériles
 - 5 mL de tampon de lyse CLD
 - l'échantillon de placenta décongelé (s'aider si besoin d'une anse stérile)
3. Procéder à la lyse mécanique en vortexant chaque tube Falcon jusqu'à obtention d'un aspect et d'une couleur homogènes.
4. Incuber ces solutions parafilmées pendant 30 minutes dans le bain marie à 56° sous agitation (à environ 200 rpm)
5. Identifier des tubes sérothèques stériles par le numéro de demande (sur le tube, et le bouchon)
6. A l'issue de l'incubation :
 - Transférer 1300 µL de la solution de lyse placentaire dans chacun des tubes sérothèques (incubation bloc chauffant) ou dans un tube Falcon de 15 mL (incubation bain-marie)
 - Ajouter 40 µL de protéinase K
 - Homogénéiser l'ensemble au vortex
7. Ré-incuber les tubes avec la protéinase K (parafilmés)
 - soit sur la journée, soit sur la nuit
 - sur bloc chauffant ou dans le bain marie, préalablement chauffé à 56°C
8. Récupérer les échantillons après 6h d'incubation minimum
9. Homogénéiser

5. EXTRACTION

5.1 REACTIFS

- Kit Extraction RSC Blood DNA (Promega)

5.1 MATERIEL NECESSAIRE

- Pipette de 100-1000 µL
- Extracteur Maxwell© (Promega)

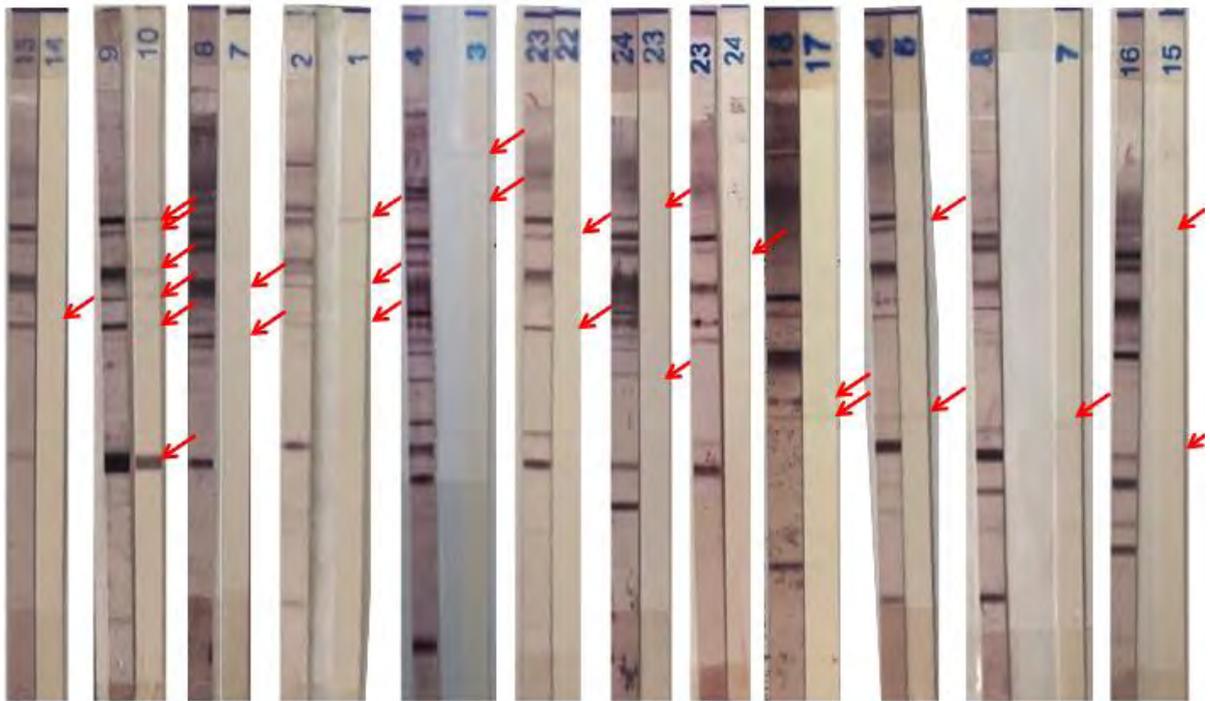
5.1 MODE OPERATOIRE

1. Choisir le protocole RSC Blood DNA
2. Retirer le rack de l'extracteur
3. Placer les cartouches (sans les homogénéiser) du kit RSC Blood DNA au centre du rack et retirer le film aluminium
4. Transférer 1 mL du lysat dans le puit n°1 de la cartouche (le puit le plus large)
5. Identifier le nombre de tubes d'éluion nécessaire (sur le bouchon et sur le côté)

-
- Placer chaque tube débouché sur l'emplacement prévu
 - Ajouter 200 µL de tampon d'élution dans chaque tube d'élution
 - Placer un « plongeur » dans le puit n°8 de chaque cartouche (le plus proche du tube d'élution)
6. Déposer le rack dans l'extracteur en le clipsant
 7. Vérification ultime avant lancement de l'extraction :
 - **Tubes d'élution ouverts**
 - **Plongeurs en place** et absence de plongeurs restant sur le peigne
 8. Lancer le protocole d'extraction RSC Blood DNA en appuyant sur le bouton « Start » (l'extraction dure 37 min).
 9. A la fin de l'extraction :
 - Appuyer sur « ok » pour permettre la sortie du rack
 - Boucher immédiatement les tubes d'élution, avant de retirer le rack
 - Sortir le rack
 - Récupérer les tubes d'élution et jeter les cartouches
 - Nettoyer au surfanios le rack
 10. Remettre le rack à son emplacement dans l'extracteur. Le protocole de décontamination aux UV « Sanitize » (destruction de l'ADN, 15 minutes) est à lancer si l'automate est utilisé en fin de journée
 11. Congeler les tubes d'élutions en attendant l'amplification par PCR

(tiré de la base des fichiers Ennov de l'Intranet du CHU de Nantes)

Annexe 4 : Juxtaposition des 12 PIC identiques



Les bandelettes maternelles sont situées à gauche de chaque PIC, et les bandelettes du bébé à droite.
Les flèches rouges pointent les bandes du bébé retrouvées aussi chez la maman

BIBLIOGRAPHIE

1. Carole G. Haute Autorité de santé. 2017;80.
2. GUYONNAUD Coralie. 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. Nantes; 2018.
3. Weiss LM, Dubey JitenderP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. International Journal for Parasitology. juill 2009;39(8):895-901.
4. Dubey JP. The History of *Toxoplasma gondii* —The First 100 Years. Journal of Eukaryotic Microbiology. nov 2008;55(6):467-75.
5. Sabin A. *TOXOPLASMA* AND OBLIGATE INTRA- CELLULAR PARASITISM. Science. 1937;85(2205):3.
6. Sabin A. Toxoplasmic encephalitis in children. The Journal of The American Medical Association. 1941;116(9):7.
7. Khan A. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Research. 16 mai 2005;33(9):2980-92.
8. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 25 juill 2006;103(30):11423-8.
9. Robert-Gangneux F, Darde M-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. Clinical Microbiology Reviews. 1 avr 2012;25(2):264-96.
10. Dubey. Redescription of *Hammondia hammondi* and its differentiation from *Toxoplasma gondii*. Int J for Par. 2003;
11. Bertranpetit E. Sur l'origine de *Toxoplasma Gondii*: approches phylogénétique et spatialement-explicite pour la détermination de l'origine géographique d'un parasite ubiquiste. :150.
12. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology. nov 2000;30(12-13):1217-58.
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. 1 avr 1998;11(2):267-99.
14. Goldman M, Carver RK, Sulzer AJ. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by Internal Budding. The Journal of Parasitology. avr 1958;44(2):161.

15. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology. juill 1998;28(7):1019-24.
16. Dubey JP. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitology. janv 1998;116(1):43-50.
17. Dubey JP. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma Gondii* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 9 juin 2020]. p. 1-17. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123964816000015>
18. Ferguson DJP, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol Res. 1987;73(6):483-91.
19. Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii*. The Journal of Parasitology. févr 1960;46(1):11.
20. Dubey JP, Frenkel JK. Feline Toxoplasmosis from Acutely Infected Mice and the Development of *Toxoplasma* Cysts*. The Journal of Protozoology. nov 1976;23(4):537-46.
21. Ferguson DJP, Birch-Andersen A, Sum JChr, Hutchison WM. Ultrastructural Studies on the Sporulation of Oocysts of *Toxoplasma Gondii*: I. Development of the Zygote and Formation of the Sporoblasts. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology. 15 août 2009;87B(1-6):171-81.
22. Dumètre A, Dardé M-L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? FEMS Microbiol Rev. déc 2003;27(5):651-61.
23. ANOFEL. Toxoplasmose. 2014. 16 p.
24. AFSSA. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'Afssa. 2005 p. 318.
25. Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OCH, Blixt JA. Oocyst-Induced Murine Toxoplasmosis: Life Cycle, Pathogenicity, and Stage Conversion in Mice Fed *Toxoplasma gondii* Oocysts. The Journal of Parasitology. oct 1997;83(5):870.
26. Dubey JP, Frenkel JK. Experimental *Toxoplasma* Infection in Mice with Strains Producing Oocysts. The Journal of Parasitology. juin 1973;59(3):505.
27. Dubey JP. Bradyzoite-Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradvzoites of - Different Strains of *Toxoplasma gondii*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 2 mai 2007;44(6):592-602.
28. Joiner KA, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. Infection and Immunity. 1993;61(4):1169-72.

29. Gross U, Bohne W, Soète M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitology Today. janv 1996;12(1):30-3.
30. Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats*. The Journal of Protozoology. févr 1972;19(1):155-77.
31. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. International Journal for Parasitology. févr 2005;35(2):193-206.
32. Santos TR dos, Nunes CM, Luvizotto MCR, Moura AB de, Lopes WDZ, Costa AJ da, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. Veterinary Parasitology. juill 2010;171(1-2):53-7.
33. Ferguson DJP. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends in Parasitology. août 2002;18(8):351-5.
34. Dubey JP. Infectivity and Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* Oocysts for Cats. The Journal of Parasitology. déc 1996;82(6):957.
35. Dubey JP, Lunney JK, Shen SK, Kwok OCH, Ashford DA, Thulliez P. Infectivity of Low Numbers of *Toxoplasma gondii* Oocysts to Pigs. The Journal of Parasitology. juin 1996;82(3):438.
36. Dubey JP. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii* : a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. Parasitology. juill 1997;115(1):15-20.
37. Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in the United States. CLIN INFECT DIS. 15 sept 2009;49(6):878-84.
38. Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, et al. PREVALENCE OF VIABLE *TOXOPLASMA GONDII* IN BEEF, CHICKEN, AND PORK FROM RETAIL MEAT STORES IN THE UNITED STATES: RISK ASSESSMENT TO CONSUMERS. Journal of Parasitology. oct 2005;91(5):1082-93.
39. Halos L, Thébault A, Aubert D, Thomas M, Perret C, Geers R, et al. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. International Journal for Parasitology. févr 2010;40(2):193-200.
40. Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of High Temperature on Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork. The Journal of Parasitology. avr 1990;76(2):201.
41. Ryning FW. Probable Transmission of *Toxoplasma gondii* by Organ Transplantation. Ann Intern Med. 1 janv 1979;90(1):47.

42. Fernandez-Sabe N, Cervera C, Farinas MC, Bodro M, Munoz P, Gurgui M, et al. Risk Factors, Clinical Features, and Outcomes of Toxoplasmosis in Solid-Organ Transplant Recipients: A Matched Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*. 1 févr 2012;54(3):355-61.
43. Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, Jones JL. Sporulation and Survival of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Different Types of Commercial Cat Litter. *Journal of Parasitology*. oct 2011;97(5):751-4.
44. Gómez-Marin JE, de-la-Torre A, Angel-Muller E, Rubio J, Arenas J, Osorio E, et al. First Colombian Multicentric Newborn Screening for Congenital Toxoplasmosis. Cappello M, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 31 mai 2011;5(5):e1195.
45. Dumètre A, Le Bras C, Baffet M, Meneceur P, Dubey JP, Derouin F, et al. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Veterinary Parasitology*. mai 2008;153(3-4):209-13.
46. Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferté H, Inglard J-C, Denis-Bisiaux H, et al. Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* Oocyst Detection in Water. *AEM*. juill 2004;70(7):4035-9.
47. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jennum PA, et al. Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. 2000;321:6.
48. Caradonna T, Marangi M, Del Chierico F, Ferrari N, Reddel S, Bracaglia G, et al. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiology*. oct 2017;67:67-75.
49. Desmonts G, Couvreur J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull New York Acad Med*. 1974;(50):146.
50. Guy EC, Joynson DHM. Potential of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Active *Toxoplasma* Infection by Detection of Parasite in Blood. *Journal of Infectious Diseases*. 1 juill 1995;172(1):319-22.
51. Bonametti M, Passos J. Probable Transmission of Acute Toxoplasmosis Through Breast Feedin. *Journal of Tropical Pediatrics*. 1997;(43):116-116.
52. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 2004;363.
53. Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic Chorioretinitis in the Setting of Acute Acquired Toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases*. 1 août 1996;23(2):277-82.
54. Delair E, Monnet D, Grabar S, Dupouy-Camet J, Yera H, Brézin AP. Respective Roles of Acquired and Congenital Infections in Presumed Ocular Toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*. déc 2008;146(6):851-5.

55. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *Journal of Infectious Diseases*. 1 déc 1995;172(6):1561-6.
56. Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, et al. Fatal Outbreak of Human Toxoplasmosis along the Maroni River: Epidemiological, Clinical, and Parasitological Aspects. *Clinical Infectious Diseases*. 1 oct 2007;45(7):e88-95.
57. Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, et al. Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 nov 2002;40(11):4037-44.
58. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *THE LANCET*. 1997;350:5.
59. Rogers NM, Peh C-A, Faull R, Pannell M, Cooper J, Russ GR. Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. *Transplant Infect Dis*. févr 2008;10(1):71-4.
60. Botterel F, Ichai P, Feray C, Bouree P, Saliba F, Tur Raspa R, et al. Disseminated Toxoplasmosis, Resulting from Infection of Allograft, after Orthotopic Liver Transplantation: Usefulness of Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mai 2002;40(5):1648-50.
61. Roemer E, Blau IW, Basara N, Kiehl MG, Bischoff M, Gunzelmann S, et al. Toxoplasmosis, a Severe Complication in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Successful Treatment Strategies during a 5-Year Single-Center Experience. *Clinical Infectious Diseases*. 1 janv 2001;32(1):e1-8.
62. Luft, Remington. Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. *Clinical Inf Disease*. 1992;211-9.
63. Gray F, Gherardi R, Poirier J. Diffuse « encephalitic » cerebral toxoplasmosis in AIDS. :5.
64. Jones JL, Sehgal M, Maguire JH. Toxoplasmosis-Associated Deaths among Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in the United States, 1992-1998. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(8):1161.
65. Rabaud C, May T, Lucet JC, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Pulmonary Toxoplasmosis in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus: A French National Survey. *Clinical Infectious Diseases*. 1 déc 1996;23(6):1249-54.
66. Ganji, Tan, Meitar. Gastric Toxoplasmosis in a Patient With Acquired Immunodeficiency Syndrome. A Case Report and Review of the Literature. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(6).
67. Delair E, Latkany P, Noble AG, Rabiah P, McLeod R, Brézin A. Clinical Manifestations of Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation*. avr

2011;19(2):91-102.

68. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. *American Journal of Ophthalmology*. déc 2003;136(6):973-88.
69. Kuo I, Rao NA. Ocular disease in AIDS. :17.
70. Brezin, Delair. Toxoplasmose oculaire. *Encycl Med Chir Ophtalmology*. 2003;
71. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *THE LANCET*. 1999;353:5.
72. Gay-Andrieu F, Marty P, Pialat J, Sournies G, de Laforte TD, Peyron F. Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. *Prenat Diagn*. juill 2003;23(7):558-60.
73. National Cancer Institute. Disease-Free Survival. In: Definitions [Internet]. Qeios; 2020 [cité 9 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.qeios.com/read/definition/40908>
74. Remington JS, éditeur. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2011. 1260 p.
75. Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brézin AP, Thulliez P, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Eurosurveillance* [Internet]. 24 juin 2010 [cité 9 juin 2020];15(25). Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.25.19600-en>
76. Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, Paul M, Prusa A, Buffolano W, et al. Prenatal Treatment for Serious Neurological Sequelae of Congenital Toxoplasmosis: An Observational Prospective Cohort Study. Fisk NM, éditeur. *PLoS Med*. 12 oct 2010;7(10):e1000351.
77. 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. *American Journal of Ophthalmology*. sept 2008;146(3):375-384.e4.
78. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M, et al. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. Campos MAS, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 13 août 2008;2(8):e277.
79. Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis : a prospective study of 378 Pregnancies. *NEJM*. 1974;290:1110-6.
80. SYROCOT. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis : a metaanalysis of individual patients' data. *Lancet*. 2007;369(115):22.
81. Bénard A, Petersen E, Salamon R, Chêne G, Gilbert R, Salmi LR, et al. Survey of

European programmes for the epidemiological surveillance of congenital toxoplasmosis. Eurosurveillance [Internet]. 10 avr 2008 [cité 9 juin 2020];13(15). Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.13.15.18834-en>

82. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé M, Cohen R, Dumètre A, Yera H, et al. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *J INFECT DIS*. 15 janv 2009;199(2):280-5.

83. Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction on Amniotic Fluid for Congenital Toxoplasmosis. 2001;97(2):5.

84. Gras L, Gilbert R, Ades A, Dunn D. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. *International Journal of Epidemiology*. déc 2001;30(6):1309-13.

85. Centre national de référence de la Toxoplasmose. Plan du rapport annuel d'activité 2018. Reims; 2019 p. 69.

86. Picone O, et al. Toxoplasmosis screening during pregnancy in France: Opinion of an expert panel for the CNGO. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2020;

87. Liu Q, Wang Z-D, Huang S-Y, Zhu X-Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites Vectors*. déc 2015;8(1):292.

88. Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *J INFECT DIS*. 15 févr 2002;185(s1):S73-82.

89. Nascimento FS, Suzuki LA, Rossi CL. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenat Diagn*. août 2008;28(8):749-52.

90. Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS. IgA Antibodies for Diagnosis of Acute Congenital and Acquired Toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1990;162(1):270-3.

91. Ashburn D, Chatterton JMW, Evans R, Joss AWL, Ho-Yen DO. Success in the *Toxoplasma* Dye Test. *Journal of Infection*. janv 2001;42(1):16-9.

92. Fulton JD, Turk JL. DIRECT AGGLUTINATION TEST FOR *TOXOPLASMA GONDII*. *The Lancet*. déc 1959;274(7111):1068-9.

93. Remington JS, Eimstad WM, Araujo FG. Detection of immunoglobulin M antibodies with antigen-tagged latex particles in an immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983;17(5):939-41.

94. Murat J-B, Fricker Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Review of Anti-infective Therapy*. sept 2013;11(9):943-56.

95. Sucilathangam G, Palaniappan N, Sreekumar C, Anna T. IgG - Indirect fluorescent antibody technique to detect seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in immunocompetent and immunodeficient patients in southern districts of Tamil Nadu. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(4):354.
96. Miller MA, Gardner IA, Packham A, Mazet JK, Hanni KD, Jessup D, et al. EVALUATION OF AN INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST (IFAT) FOR DEMONSTRATION OF ANTIBODIES TO *TOXOPLASMA GONDII* IN THE SEA OTTER (*ENHYDRA LUTRIS*). :6.
97. Tomasi JP, Schlit AF, Stadtsbaeder S. Rapid double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin M anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology.* 1986;24(5):849-50.
98. Pfrepper K-I, Enders G, Gohl M, Krczal D, Hlobil H, Wassenberg D, et al. Seroreactivity to and Avidity for Recombinant Antigens in Toxoplasmosis. *CVI.* août 2005;12(8):977-82.
99. Lefevre-Pettazzoni M, Bissery A, Wallon M, Cozon G, Peyron F, Rabilloud M. Impact of Spiramycin Treatment and Gestational Age on Maturation of *Toxoplasma gondii* Immunoglobulin G Avidity in Pregnant Women. *CVI.* mars 2007;14(3):239-43.
100. Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *Journal of clinical microbiology.* 1996;34(6):1506-11.
101. Meek B, Jan Diepersloot R, van Gool T, Speijer D, Peek R. Igm recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by sera of acutely or latently infected humans. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* janv 2003;45(1):45-52.
102. Bobic, Sybalic. High Levels of IgM Antibodies Specific of *Toxoplasma gondii* in Pregnancy 12 years after Primary Toxoplasma Infection. *Gynecol Obstr Invest.* 1991;(31):182-4.
103. Hedman K, Lappalainen M, Seppaia I, Makela O. Recent Primary *Toxoplasma* Infection Indicated by a Low Avidity of Specific IgG. *Journal of Infectious Diseases.* 1 avr 1989;159(4):736-40.
104. Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *toxoplasma* infection in pregnancy? *Journal of Clinical Pathology.* 1 avr 1998;51(4):312-5.
105. Buffolano W, Lappalainen M, Hedman L, Ciccimarra F, Del Pezzo M, Rescaldani R, et al. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2004;23(11):825-30.
106. Bonyadi MR. Modification and Evaluation of Avidity IgG Testing for Differentiating of *Toxoplasma gondii* Infection in Early Stage of Pregnancy. *CELL*

JOURNAL. 2013;15(3):6.

107. Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, Naguleswaran A, Hemphill A. PERFORMANCE OF A WESTERN IMMUNOBLOT ASSAY TO DETECT SPECIFIC ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* IGG ANTIBODIES IN HUMAN SALIVA. *Journal of Parasitology*. juin 2005;91(3):561-3.

108. Robert-Gangneux F, Commere V, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Performance of a Western Blot Assay to Compare Mother and Newborn Anti-*Toxoplasma* Antibodies for the Early Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1 oct 1999;18(9):648-54.

109. Balfour AH, Bridges JB, Harford JP. An evaluation of the ToxHA test for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human serum. *Journal of Clinical Pathology*. 1 juill 1980;33(7):644-7.

110. Wang Y-H, Li X-R, Wang G-X, Yin H, Cai X-P, Fu B-Q, et al. Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigens. *Parasitology International*. janv 2011;60(1):105-7.

111. Dubey JP, Darrington C, Tiao N, Ferreira LR, Choudhary S, Molla B, et al. Isolation of Viable *Toxoplasma gondii* from Tissues and Feces of Cats from Addis Ababa, Ethiopia. *Journal of Parasitology*. févr 2013;99(1):56-8.

112. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science, New Series*. 1988;239(4839):487-91.

113. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989;27(8):1787-92.

114. Khalifa K el-S, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32(11):2813-9.

115. Ho-Yen DO, Joss AW, Balfour AH, Smyth ET, Baird D, Chatterton JM. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *Journal of Clinical Pathology*. 1 oct 1992;45(10):910-3.

116. Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa J-M. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis*. déc 2003;3(1):7.

117. Hardinge P, Murray JAH. Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. *Sci Rep*. déc 2019;9(1):7400.

118. Lin Z, Zhang Y, Zhang H, Zhou Y, Cao J, Zhou J. Comparison of loop-mediated

isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*. avr 2012;185(2- 4):296-300.

119. 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.
120. Blaakær J. Ultrasonic Diagnosis of Fetal Ascites and Toxoplasmosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. janv 1986;65(6):653-4.
121. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. *Clin Microbiol Reviews*. 12 sept 2018;31(4):e00057-17, /cmr/31/4/e00057-17.atom.
122. Peyron F, L'ollivier C, Mandelbrot L, Wallon M, Piarroux R, Kieffer F, et al. Maternal and Congenital Toxoplasmosis: Diagnosis and Treatment Recommendations of a French Multidisciplinary Working Group. *Pathogens*. 18 févr 2019;8(1):24.
123. Kaparos N, Favrat B, D'Acromont V. Fever and Lymphadenopathy: Acute Toxoplasmosis in an Immunocompetent Patient. *Rev Med Suisse*. 2014;452(10):2264.
124. Holland GN, Lewis KG. An Update on Current Practices in the Management of Ocular Toxoplasmosis. *AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY*. 2002;134(1):13.
125. Jasper S, Vedula SS, John SS, Horo S, Sepah YJ, Nguyen QD. Corticosteroids as adjuvant therapy for ocular toxoplasmosis. *Cochrane Eyes and Vision Group, éditeur. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]*. 26 janv 2017 [cité 9 juin 2020]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD007417.pub3>
126. Reich M, Mackensen F. Ocular toxoplasmosis: background and evidence for an antibiotic prophylaxis. *Current Opinion in Ophthalmology*. nov 2015;26(6):498-505.
127. Fernández-Ruiz M, Meije Y, Manuel O, Akan H, Carratalà J, Aguado JM, et al. ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Introduction). *Clinical Microbiology and Infection*. juin 2018;24:S2-9.
128. Carole G. Haute Autorité de santé - Patients immunodéprimés. 2017;87.
129. Porter. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1992;327(22):1643-7.
130. Katlama C, Wit SD, O'Doherty E, Glabeke MV, Clumeck N, Group TEN for T of A (ENTA) TS. Pyrimethamine-Clindamycin vs. Pyrimethamine-Sulfadiazine as Acute and Long-Term Therapy for Toxoplasmic Encephalitis in Patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*. 1996;22(2):268-75.
131. Dedicat M, Livesley N. Management of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected

adults (with an emphasis on resource-poor settings). In: The Cochrane Collaboration, éditeur. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [cité 9 juin 2020]. p. CD005420. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD005420>

132. Djawe K, Buchacz K, Hsu L, Chen M-J, Selik RM, Rose C, et al. Mortality Risk After AIDS-Defining Opportunistic Illness Among HIV-Infected Persons—San Francisco, 1981–2012. *J Infect Dis*. 1 nov 2015;212(9):1366-75.

133. Prusa A-R, Kasper DC, Olischar M, Husslein P, Pollak A, Hayde M. Evaluation of Serological Prenatal Screening To Detect *Toxoplasma gondii* Infections in Austria. *Neonatology*. 2013;103(1):27-34.

134. Wallon M, Peyron F, Cornu C, Vinault S, Abrahamowicz M, Kopp CB, et al. Congenital *Toxoplasma* Infection: Monthly Prenatal Screening Decreases Transmission Rate and Improves Clinical Outcome at Age 3 Years. *Clin Infect Dis*. 1 mai 2013;56(9):1223-31.

135. Vogel N, Kirisits M, Michael E, Bach H, Hostetter M, Boyer K, et al. Congenital Toxoplasmosis Transmitted from an Immunologically Competent Mother Infected Before Conception. *Clinical Infectious Diseases*. 1 nov 1996;23(5):1055-60.

136. Peyron F, McLeod R, Ajzenberg D, Contopoulos-Ioannidis D, Kieffer F, Mandelbrot L, et al. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. Torgerson PR, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 16 févr 2017;11(2):e0005222.

137. Prusa A-R, Kasper DC, Sawers L, Walter E, Hayde M, Stillwaggon E. Congenital toxoplasmosis in Austria: Prenatal screening for prevention is cost-saving. Gilman RH, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 10 juill 2017;11(7):e0005648.

138. Paquet C, Yudin MH, Yudin MH, Allen VM, Bouchard C, Boucher M, et al. Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. janv 2013;35(1):78-9.

139. Valentini P, Annunziata ML, Angelone DF, Masini L, De Santis M, Testa A, et al. Role of spiramycin/cotrimoxazole association in the mother-to-child transmission of toxoplasmosis infection in pregnancy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. mars 2009;28(3):297-300.

140. Valentini P, Buonsenso D, Barone G, Serranti D, Calzedda R, Ceccarelli M, et al. Spiramycin/cotrimoxazole versus pyrimethamine/sulfonamide and spiramycin alone for the treatment of toxoplasmosis in pregnancy. *J Perinatol*. févr 2015;35(2):90-4.

141. Prusa A-R, Kasper DC, Pollak A, Olischar M, Gleiss A, Hayde M. Amniocentesis for the detection of congenital toxoplasmosis: results from the nationwide Austrian prenatal screening program. *Clinical Microbiology and Infection*. févr 2015;21(2):191.e1-191.e8.

142. Filisetti, Villena. Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr>
143. Stillwaggon E, Carrier CS, Sautter M, McLeod R. Maternal Serologic Screening to Prevent Congenital Toxoplasmosis: A Decision-Analytic Economic Model. Webster JP, éditeur. PLoS Negl Trop Dis. 27 sept 2011;5(9):e1333.
144. Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. Cochrane Pregnancy and Childbirth Group, éditeur. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 26 juill 1999 [cité 9 juin 2020]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001684>
145. Thiébaud R, Leroy V, Alioum A, Binquet C, Poizat G, Salmi LR, et al. Biases in observational studies of the effect of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. janv 2006;124(1):3-9.
146. Mandelbrot L, Kieffer F, Sitta R, Laurichesse-Delmas H, Winer N, Mesnard L, et al. Prenatal therapy with pyrimethamine + sulfadiazine vs spiramycin to reduce placental transmission of toxoplasmosis: a multicenter, randomized trial. American Journal of Obstetrics and Gynecology. oct 2018;219(4):386.e1-386.e9.
147. Montoya JG. Systematic screening and treatment of toxoplasmosis during pregnancy: is the glass half full or half empty? American Journal of Obstetrics and Gynecology. oct 2018;219(4):315-9.
148. Lebech, Joyhson, Thulliez, Gilbert. Classification System and Case Definitions of *Toxoplasma Gondii* Infection in Immunocompetent Pregnant Women and Their Congenitally Infected Offspring. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 1996;10(15):799-805.
149. McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, et al. Outcome of Treatment for Congenital Toxoplasmosis, 1981–2004: The National Collaborative Chicago- Based, Congenital Toxoplasmosis Study. :12.
150. Jaisson-Hot, Wallon, Kurdi, Thulliez. Congenital Toxoplasmosis. Transitory Negative Serology. Press Med. 2001;20(30):1001-4.
151. Wallon M, Cozon G, Ecochard R, Lewin P, Peyron F. Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. Eur J Pediatr. sept 2001;160(9):534-40.
152. Wallon M, Garweg JG, Abrahamowicz M, Cornu C, Vinault S, Quantin C, et al. Ophthalmic Outcomes of Congenital Toxoplasmosis Followed Until Adolescence. PEDIATRICS. 1 mars 2014;133(3):e601-8.
153. Zhang Y, Lin X, Lu F. Current treatment of ocular toxoplasmosis in

- immunocompetent patients: a network meta-analysis. *Acta Tropica*. sept 2018;185:52-62.
154. 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*. 1 juin 2004;113(6):1567-72.
155. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. juill 2012;10(7):815-28.
156. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. janv 2016;84(1):22-33.
157. Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. nov 2012;44(11):805-14.
158. Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Schaal J-P, Equy V, Bost-Bru C, Pelloux H. VALUE OF *TOXOPLASMA GONDII* DETECTION IN ONE HUNDRED THIRTY-THREE PLACENTAS FOR THE DIAGNOSIS OF CONGENITAL TOXOPLASMOSIS: The Pediatric Infectious Disease Journal. sept 2007;26(9):845-6.
159. L'Ollivier C, Wallon M, Faucher B, Piarroux R, Peyron F, Franck J. Comparison of Mother and Child Antibodies That Target High-Molecular-Mass *Toxoplasma gondii* Antigens by Immunoblotting Improves Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol*. août 2012;19(8):1326-8.
160. American Academy of Pediatrics. Red Book 2015 : Report of the Committee on Infectious Diseases. 30^e éd. 2015.
161. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juin 2001;39(6):2267-71.
162. Rilling, Dietz, Krczal, Knotek. Evaluation of a Commercial IgG/IgM Western Blot Assay for Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22(3):174.
163. Tissot Dupont D, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Usefulness of Western Blot in Serological Follow-Up of Newborns Suspected of Congenital Toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. févr 2003;22(2):122-5.
164. Magi, Migliorini. Western Blotting for the Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *New Microbiol*. 2011;34(1):93-5.
165. Potasman, Araujo, Thulliez, Desmonts G. *Toxoplasma Gondii* Antigens Recognized

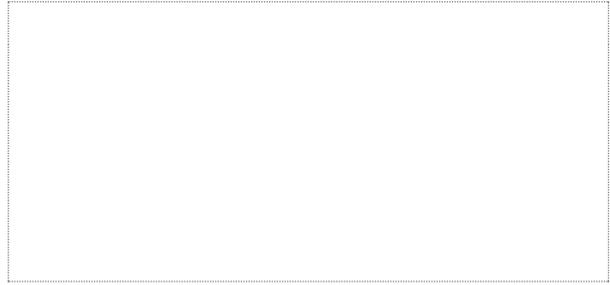
by Sequential Samples of Serum Obtained From Congenitally Infected Infants. J Clin Microbiol. 1987;10(25):1926-31.

166. Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, et al. Contributions of Immunoblotting, Real-Time PCR, and the Goldmann-Witmer Coefficient to Diagnosis of Atypical Toxoplasmic Retinochoroiditis. Journal of Clinical Microbiology. 1 juill 2009;47(7):2131-5.

167. Ronday MJH, Ongkosuwito JV, Rothova A, Kijlstra A. Intraocular anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody production in patients with ocular toxoplasmosis. American Journal of Ophthalmology. mars 1999;127(3):294-300.

Vu, le Président du Jury,

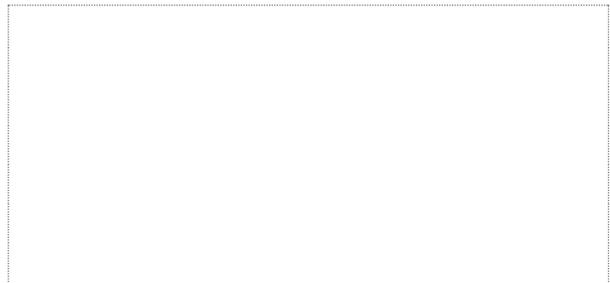
(tampon et signature)



Professeur Didier LEPELLETIER

Vu, le Directeur de Thèse,

(tampon et signature)



Docteur Rose-Anne LAVERGNE

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET

NOM : BARRAUD

PRENOM : Claire

Titre de Thèse :

Optimisation du diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale en période néonatale : biologie moléculaire et profil immunologique comparé

RESUME (10 lignes)

La toxoplasmose est une maladie pouvant avoir de lourdes conséquences en cas de transmission materno-fœtale. La recherche de l'atteinte de l'enfant est une priorité. Il se fait notamment en néonatal par l'étude du placenta et de la réponse immunitaire du nouveau-né. Grâce à une étude prospective, ce travail a permis d'abandonner définitivement l'étude du placenta par inoculation à la souris, au profit de la qPCR. Une deuxième étude, cette fois ci rétrospective, a proposé une nouvelle indication des profils immunologiques comparés mère/enfant à la naissance en cas d'indice ISAGA IgM négatif. Ces deux études permettent d'optimiser le diagnostic de toxoplasmose congénitale dès la période néonatale au CHU de Nantes.

MOTS-CLES

TOXOPLASMA GONDII / TOXOPLASMOSE CONGÉNITALE / PCR / PLACENTA / IMMUNOBLLOT / PROFIL COMPARE