

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE MÉDECINE



106 024589 0



ANNÉE 1995



THÈSE N° 116 11

**LA PCR DANS LE  
DIAGNOSTIC DE LA  
TOXOPLASMOSE**

Mise au point d'une technique  
sur des prélèvements de  
liquide amniotique, de sang et  
d'humeur aqueuse

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

obtenu après la soutenance du

**MÉMOIRE**

**du Diplôme d'études Spécialisées de Biologie médicale**

présenté et soutenue publiquement

le 21 Mars 1995 à Limoges

par

**Marie-Pierre MAUREL épouse PRADIÉ**

Née le 23 Juin 1964 à MANOSQUE (Alpes de Haute Provence)

JURY

Mademoiselle le Professeur Marie-Laure DARDÉ

Monsieur le Professeur Jean-Paul ADENIS

Monsieur le Professeur Jean BOULESTEIX

Monsieur le Professeur Jean Albert NICOLAS

Monsieur le Professeur Pierre WEINBRECK

Monsieur le Docteur Yves AUBARD

Président

Juge

Juge

Juge

Juge

Membre invité

ex: 3

sibil:

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE MÉDECINE

ANNÉE 1995



THÈSE N° 416

**LA PCR DANS LE  
DIAGNOSTIC DE LA  
TOXOPLASMOSE**

Mise au point d'une technique  
sur des prélèvements de  
liquide amniotique, de sang et  
d'humeur aqueuse

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

obtenu après la soutenance du

**MÉMOIRE**

**du Diplôme d'études Spécialisées de Biologie médicale**

présenté et soutenue publiquement

le 21 Mars 1995 à Limoges

par

**Marie-Pierre MAUREL épouse PRADIÉ**

Née le 23 Juin 1964 à MANOSQUE (Alpes de Haute Provence)

**JURY**

Mademoiselle le Professeur Marie-Laure DARDÉ  
Monsieur le Professeur Jean-Paul ADENIS  
Monsieur le Professeur Jean BOULESTEIX  
Monsieur le Professeur Jean Albert NICOLAS  
Monsieur le Professeur Pierre WEINBRECK  
Monsieur le Docteur Yves AUBARD

Président  
Juge  
Juge  
Juge  
Juge  
Membre invité

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE MÉDECINE

DOYEN DE LA FACULTÉ

Monsieur le Professeur PIVA

ASSESEURS

Monsieur le Professeur VANDROUX

Monsieur le Professeur DENIS

PERSONNEL ENSEIGNANT

\* PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ADENIS Jean-Paul.....	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc.....	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude.....	NÉPHROLOGIE
ARCHAMBAUD Françoise.....	MÉDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul .....	CHIRURGIE ORTHOPÉDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique .....	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGÉNÉTIQUE
BAUDET Jean .....	CLINIQUE OBSTÉTRICALE ET GYNÉCOLOGIE
BENSAID Julien .....	CLINIQUE MÉDICALE CARDIOLOGIE
BERNARD Philippe .....	DERMATOLOGIE
BESSEDE Jean-Pierre .....	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François .....	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie .....	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique .....	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTEIX Jean.....	PÉDIATRIE
BOUQUIER Jean-José .....	CLINIQUE DE PÉDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand.....	BIOSTATIQUE ET INFORMATIQUE MÉDICALE
BRETON Jean-Christian .....	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

CAIX Michel.....	ANATOMIE
CATANZANO Gilbert.....	ANATOMIE PATHOLOGIQUE
CHASSAIN Albert.....	PHYSIOLOGIE
CHRISTIDES Constantin.....	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COLOMBEAU Pierre.....	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre.....	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDÉ Marie-Laure.....	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel.....	PÉDIATRIE
DENIS François.....	BACTÉRIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard.....	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre.....	RÉÉDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Michel.....	NEUROLOGIE
DUMAS Jean-Philippe.....	UROLOGIE
DUMONT Daniel.....	MÉDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul.....	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MÉDICALE
FEISS Pierre.....	ANESTHÉSIOLOGIE ET RÉANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain.....	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger.....	PEDO-PSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé.....	RÉANIMATION MÉDICALE
GAY Roger.....	RÉANIMATION MÉDICALE
GERMOUTY Jean.....	PATHOLOGIE MÉDICALE ET RESPIRATOIRE
HUGON Jacques.....	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGÉNÉTIQUE
LABADIE Michel.....	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
LABROUSSE Claude.....	RÉÉDUCATION FONCTIONNELLE
LABROUSSE François.....	ANATOMIE PATHOLOGIQUE
LASKAR Marc.....	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LAUBIE Bernard.....	ENOCRINOLOGIE ET MALADIES MÉTABOLIQUES
LÉGER Jean-Marie.....	PSYCHIATRIE D'ADULTES
LEROUX-ROBERT Claude.....	NÉPHROLOGIE
LIOZON Frédéric.....	CLINIQUE MÉDICALE

MÉNIER Robert.....	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis.....	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques .....	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique .....	CHIRURGIE INFANTILE
OUTREQUIN Gérard.....	ANATOMIE
PECOUT Claude .....	CHIRURGIE ORTHOPÉDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PERDRISOT Rémy .....	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PILLEGAND Bernard .....	HÉPATO-GASTRO-ENTÉROLOGIE
PIVA Claude .....	MÉDECINE LÉGALE
PRALORAN Vincent .....	HÉMATOLOGIE ET TRANSFUSION
RAVON Robert.....	NEUROCHIRURGIE
RIGAUD Michel.....	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
ROUSSEAU Jacques .....	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MÉDICALE
SAUTEREAU Denis.....	HÉPATO-GASTRO-ENTÉROLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre.....	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
TABASTE Jean-Louis .....	GYNÉCOLOGIE OBSTÉTRIQUE
TREVES Richard.....	THÉRAPEUTIQUE
VALLAT Jean-Michel.....	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis.....	ANATOMIE
VANDROUX Jean-Claude.....	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
WEINBRECK Pierre .....	MALADIES INFECTIEUSES
MOULIN Jean-Louis .....	Professeur associé à mi-temps

SECRÉTAIRE GÉNÉRAL DE LA FACULTÉ - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

**À Jacques-Marie**

Je t'offre cette thèse..... que tu as en grande partie tapée....  
Avec tout mon amour.

**À christophe, mon fils**

Bon anniversaire.  
Avec toute mon affection.

**À mes parents**

ça y est Papa, je les ai finies, ces études !

**À ma famille**

**À tous mes amis, disséminés dans toute la France**

**À Bordeaux:** *Simone et Philippe.*

**À Lyon:** *Frédérique et Dominique*

**À Limoges:**

*Muriel et Jean-Pascal*

*Christine et Christophe*

*Magali*

*Nathalie*

Merci d'avoir supporté tous mes coups de téléphone, et de m'avoir aidé  
chaque fois que j'en ai eu besoin

**À Marseille:**

*Sandrine et Gilles*

*Claudie et Éric*

*Aziz*

*Georges*

À notre Président et directeur de thèse

**Mademoiselle le Professeur Marie-Laure DARDÉ**

Professeur des Universités de Parasitologie

Praticien hospitalier

Chef de service

*Vous nous avez confié ce travail et vous nous avez guidée  
tout au long de celui-ci.*

*Vous nous avez appris la rigueur et la persévérance.*

*Vous avez toujours su vous montrer patiente, disponible,  
aimable.*

*Trouvez ici le témoignage de notre reconnaissance et de  
notre profond respect.*

À nos juges

**Monsieur le Professeur Jean-Paul ADENIS**

Professeur des Universités d'Ophtalmologie

Ophtalmologiste des hôpitaux

Chef de service

*Vous nous avez reçu avec une grande amabilité.*

*Vous n'avez pas hésité à bousculer votre planning pour nous faire l'honneur de participer à ce jury.*

*Soyez assuré de notre respectueuse gratitude.*

**Monsieur le Professeur Jean BOULESTEIX**

Professeur des Universités de Pédiatrie

Médecin des hôpitaux

Chef de service

*Vous nous faites le grand honneur de participer, sans nous connaître, à ce jury.*

*Nous voulons vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail, et vous exprimer notre plus vive gratitude.*

**Monsieur le Professeur Jean Albert NICOLAS**

Professeur des Universités de Bactériologie - Virologie - Parasitologie

*Grâce à vous, l'enseignement de l'immunologie est devenu vivant et marquant.*

*Par votre optimisme et vos connaissances, vous nous avez soutenu tout au long de ce travail que vous acceptez aujourd'hui de juger.*

*Que cette thèse témoigne de notre profond respect.*

**Monsieur le Professeur Pierre WEINBRECK**

Professeur des Universités de Maladies Infectieuses

Médecin des hôpitaux

*Malgré votre emploi du temps chargé, vous avez accepté de venir juger ce travail.*

*Nous espérons qu'il vous aura intéressé.*

*Soyez remercié du grand honneur que vous nous faites en participant à ce jury.*

Monsieur le Docteur Yves AUBARD

Praticien hospitalier

*Vous nous avez accueilli chaque fois avec intérêt et une grande disponibilité.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre respectueuse reconnaissance.*

**Nous tenons à remercier**

**Bernard BOUTEILLE**  
pour ses conseils

**J. A. GANDJI**  
pour son aide

**Le personnel du laboratoire de parasitologie, et tout  
particulièrement**

**Christine** pour le soutien logistique  
**Muriel et Jacques** pour leur aide

**Le service de parasitologie de Mme TOURTE SCHAEFER à  
l'hôpital Cochin et, en particulier, Florence ROBERT pour  
son accueil et son enseignement.**

## PLAN

### INTRODUCTION

### RAPPEL SUR TOXOPLASMA GONDII ET LA TOXOPLASMOSE HUMAINE

1. TAXONOMIE DE T. GONDII
2. CYCLE ÉVOLUTIF
  - 2.1. Le cycle sexué
  - 2.2. Le cycle asexué
3. ÉPIDÉMIOLOGIE
  - 3.1. Prévalence
  - 3.2. Réservoir de parasites
  - 3.3. Modes de contamination
4. MORPHOLOGIE DE T. GONDII
  - 4.1. le tachyzoïte (parfois appelé trophozoïte)
  - 4.2. Le kyste et ses bradyzoïtes:
  - 4.3. Oocystes et sporozoïtes
5. STRUCTURE BIOCHIMIQUE DE T. GONDII
  - 5.1. Structure moléculaire
  - 5.2. Différences moléculaires entre les souches de T. gondii
6. ÉVOLUTION D'UNE INFECTION TOXOPLASMIQUE
  - 6.1. Évolution du parasite au sein de l'organisme
  - 6.2. Immunité antitoxoplasmique
7. ASPECTS CLINIQUES DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE
  - 7.1. Toxoplasmose acquise asymptomatique
  - 7.2. Toxoplasmose symptomatique du sujet immunocompétent
  - 7.3. Toxoplasmose de l'immunodéprimé
  - 7.4. Toxoplasmose congénitale
  - 7.5. Toxoplasmose oculaire
8. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE
  - 8.1. Méthodes
  - 8.2. Conduite à tenir sur le plan paraclinique selon le diagnostic évoqué
9. TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE
  - 9.1. Spécialités actives
  - 9.2. Indications thérapeutiques

### LA PCR

1. GÉNÉRALITÉS SUR LA PCR
  - 1.1. Bref rappel sur l'ADN
  - 1.2. Définition de la PCR
  - 1.3. Principe
  - 1.4. Les applications générales de la PCR
2. APPLICATION DE LA PCR À LA TOXOPLASMOSE
  - 2.1. Les différentes cibles
  - 2.2. Le déroulement de la réaction de PCR dans le cadre de la recherche de toxoplasmes
  - 2.3. Étude des résultats publiés sur la PCR appliquée à la toxoplasmose

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. MATÉRIEL

- 1.1. Les patients
- 1.2. Les témoins positifs
- 1.3. Les témoins négatifs

### 2. MÉTHODE

- 2.1. Traitement et conservation des prélèvements
- 2.2. Extraction de l'ADN d'après la technique décrite par LOPAREV et coll.
- 2.3. Vérification de la quantité d'ADN extrait
- 2.4. Préparation de la PCR
- 2.5. Quelques remarques concernant les précautions prises pour éviter les contaminations.

## RÉSULTATS

### 1. MISE AU POINT DE LA PCR

- 1.1. Évaluation de la sensibilité de la PCR
- 1.2. Évaluation de la spécificité de la PCR vis à vis des différentes souches de *Toxoplasma gondii*
- 1.3. Comparaison de deux techniques d'extraction de l'ADN
- 1.4. Évaluation de l'effet de l'UNG sur la PCR

### 2. RÉSULTATS DES PCR EFFECTUÉES SUR LES DIVERS PRÉLÈVEMENTS PATHOLOGIQUES

## DISCUSSION

### 1. DISCUSSION SUR LA MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE PCR

- 1.1. Interprétation de la sensibilité de la PCR
- 1.2. Interprétation de la spécificité de la PCR
- 1.3. Interprétation de la comparaison des 2 techniques d'extraction de l'ADN
- 1.4. Interprétation de l'effet de l'UNG sur la PCR

### 2. DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS SUR NOS PRÉLÈVEMENTS

- 2.1. Liquides amniotiques
- 2.2. Humeurs aqueuses
- 2.3. Sangs de sujets immunodéprimés
- 2.4. Remarque

## CONCLUSION

## ABRÉVIATIONS

## BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

L'agent de la toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, a été isolé en 1908 chez un rongeur du sud Tunisien. Il a fallu attendre plusieurs années (1913) pour se rendre compte de ses implications en pathologie humaine, en particulier dans les toxoplasmoses congénitales. À l'heure actuelle, avec le développement de cette pathologie redoutable qu'est le SIDA, la toxoplasmose a pris une importance considérable. Elle est une des principales causes parasitaires de mortalité chez le sidéen, avec *Pneumocystis carinii*.

Au cours de ce travail, nous avons voulu mettre au point et appliquer une technique de biologie moléculaire, la PCR (polymerase chain reaction) au diagnostic de la toxoplasmose.

Pourquoi une nouvelle technique, alors qu'il existe déjà de nombreuses méthodes de diagnostic biologique? (méthodes d'examen direct, méthodes sérologiques, cultures...). Curieusement, malgré toutes ces techniques, le biologiste et le clinicien se retrouvent encore bien démunis dans certains cas:

- dans les séroconversions maternelles, tout le bilan mis en œuvre revient parfois normal, alors que l'enfant est contaminé à la naissance.
- dans les chorioretinites toxoplasmiques, c'est trop souvent l'aspect des lésions et la réponse au traitement qui font le diagnostic.
- chez le sujet immunodéprimé, le bilan biologique est délicat et apporte peu d'éléments (sérologie d'interprétation aléatoire, examens directs positifs uniquement s'il existe une forte parasitémie). Là aussi, c'est souvent la clinique, les images radiologiques et la réponse au traitement qui font le diagnostic.

À l'heure où la biologie moléculaire connaît un essor important dans tous les domaines, et pour pallier à ces problèmes, la technique de PCR nous a semblé intéressante sur de nombreux points.

Cette technique consiste en effet à amplifier 2<sup>n</sup> fois un segment d'ADN du parasite et à le révéler sur gel d'électrophorèse. Les avantages de cette méthode, confirmées par de nombreuses publications, sont sa sensibilité, sa spécificité, sa rapidité, ainsi que les nombreux prélèvements sur lesquels elle peut s'appliquer.

Cette mise au point a donc été le but de notre travail qui a été divisé en deux parties:

- la mise au point proprement dite sur des témoins positifs et négatifs.
- l'analyse par la PCR:
  - de prélèvements de sang provenant de patients immunodéprimés suspects ou non de toxoplasmose.
  - de ponctions de liquide amniotique de femmes ayant présenté une séroconversion (ceci dans le but d'un jour pouvoir se passer de la ponction de sang foetal qui n'est pas un acte anodin).
  - de ponctions d'humeur aqueuse de sujets suspects de chorioretinite toxoplasmique.

RAPPEL SUR *TOXOPLASMA*  
*GONDII* ET LA  
TOXOPLASMOSE HUMAINE

1. TAXONOMIE DE *T. GONDII* [34]

- Embranchement : Protozoa
- Phylum : Apicomplexa
- Classe : Sporozoea
- Sous-classe : Coccidia
- Ordre : Eucoccidiida
- Sous-ordre : Eimeridea
- Famille : Sarcocystidae
- Sous-famille : Toxoplasmatinae
- Genre : *Toxoplasma* ( Nicolle et Manceau en 1908, découvrent un protozoaire qu'ils pensent au premier abord appartenir au genre *Leishmania*. Après observation approfondie ils le classent dans un genre nouveau baptisé *Toxoplasma* pour rappeler la forme arquée : TOXON = arc en grec).
- Espèce : *T. gondii* (qui est d'ailleurs la seule espèce de ce genre).

2. CYCLE ÉVOLUTIF

Il est assez original car il peut faire intervenir:

- Soit un cycle complet (sexué et asexué).
- Soit un cycle incomplet (asexué uniquement).

## 2.1. Le cycle sexué

Il se déroule exclusivement chez l'hôte définitif, c'est à dire chez les félidés. Le mode de contamination est oral par ingestion, soit de kystes contenant des bradyzoïtes, soit d'oocystes qui vont libérer des sporozoïtes. Les éléments parasites vont envahir les cellules épithéliales jéjunales, donnant naissance à des schizontes par endodyogénie et/ou schizogonie [34].

Peu de temps après, il y a apparition de gamétocytes qui se différencient soit en macrogamètes femelles, soit en microgamètes mâles.

La fécondation par pénétration d'un microgamète dans le macrogamète aboutit à la formation d'un oocyste. Après avoir acquis une paroi résistante, il sera émis dans les fèces sous forme non sporulée (donc non infestante).

La maturation, qui a lieu dans le milieu extérieur, peut alors commencer et aboutira à l'oocyste contaminant.

Il faut noter :

1°) que cette phase d'excrétion d'oocystes est intense et transitoire (quelques millions d'oocystes pendant quelques jours). Elle ne pourra réapparaître qu'au cours d'une réinfestation chez l'animal immunodéprimé.

2°) que chez les félidés se déroule, parallèlement à ce cycle sexué, le cycle asexué qui aboutit à la formation de kystes tissulaires.

## 2.2. Le cycle asexué

- L'homme et les animaux s'infestent par ingestion de kystes ou d'oocystes. Les bradyzoïtes ou les sporozoïtes, libérés par les sucs digestifs, vont rapidement se transformer en tachyzoïtes et envahir **tous les systèmes cellulaires**. De là, après une phase de parasitémie de durée variable selon les individus et peut-être selon la souche parasitaire, il y aura formation de kystes tissulaires.

- À noter un autre moyen d'invasion : **la voie transplacentaire**. Au cours de cette phase de parasitémie, il peut y avoir passage de tachyzoïtes de la circulation maternelle au fœtus, à travers le filtre placentaire.

### 3. ÉPIDÉMIOLOGIE

#### 3.1. Prévalence

La toxoplasmose est une anthroponose ubiquitaire dont la prévalence varie énormément selon l'espèce étudiée et le lieu géographique. Pour l'homme en particulier, la prévalence diminue lorsque le niveau socio-économique augmente et que le climat devient plus rigoureux.

Exemple :	France	environ 65% [17, 34]
	États Unis, Grande Bretagne	environ 30% [34]
	Salvador	environ 90% [34]
	Alaska	0% [34]

#### 3.2. Réservoir de parasites

Il est constitué par:

- Les animaux à sang chaud (kystes)  
Parmi eux : le mouton et le porc jouent un rôle direct très important dans l'épidémiologie de la toxoplasmose humaine en France. Mais d'autres animaux (volailles, lapins,...) peuvent être à l'origine de la contamination humaine.
- Le milieu extérieur et les félidés (oocystes)  
Le chat s'infeste généralement précocement (dès ses débuts de chasseur) mais n'est contaminant pour l'homme que pendant quelques jours. Par contre, les litières et l'environnement peuvent contenir des oocystes pendant très longtemps et seront durablement infestants.

Il faut noter d'ailleurs la grande résistance des oocystes:

- à la chaleur : 50 °C pendant 30 mn
- à la congélation : -21 °C pendant 28 jours
- aux produits chimiques : hypochlorite de sodium à 6%, acide sulfurique à 0,5 N et alcool à 95 ° pendant 1 heure.

Ils restent cependant sensibles au formol.

La résistance des kystes est moindre mais non négligeable : plusieurs jours sur les cadavres, plusieurs mois à 4 °C. Ils sont détruits par la chaleur à 56 °C, et ils voient leur infectivité diminuée à -20 °C.

### 3.3. Modes de contamination

- Oral (viandes, légumes, eau souillée, litière,...)
- Réinfestation endogène au cours de l'immunodépression
- Fœto-maternelle
- Iatrogène (greffe de moelle osseuse, transfusion de leucocytes, transplantation d'organes)
- Accidentelle (manipulation de souches en laboratoire)

## 4. MORPHOLOGIE DE *T. GONDII*

### 4.1. le tachyzoïte (parfois appelé trophozoïte)

En forme de croissant de 6 à 8  $\mu\text{m}$  de long, il est limité par une membrane trilamellaire.

À l'avant :

- **Le complexe apical**  
(caractéristique du phylum  
Apicomplexa) avec :

- le **conoïde** (structure fibrillaire enroulée en spirale)
- l'**anneau polaire** à sa base, servant d'insertion à :
- **22 microtubules**
- les **rhoptries** (environ 10) en forme de massue, occupant le tiers antérieur du parasite.
- les **granules denses**
- les **micronèmes**

Ce complexe apical, par les mouvements de torsion qu'il engendre et les enzymes qu'il peut excréter joue un rôle actif dans la pénétration cellulaire.

On retrouve ensuite les organites habituels des cellules :

- le **noyau**
- les **mitochondries**

- le réticulum endoplasmique

- l'appareil de Golgi.

#### 4.2. Le kyste et ses bradyzoïtes:

Le kyste (20 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre) représente la forme de résistance et de latence du parasite dans l'organisme. Il siège préférentiellement au sein des tissus musculaires, nerveux et pulmonaires. Il renferme des bradyzoïtes au métabolisme très ralenti et dont la structure est proche de celle du tachyzoïte. Les grandes différences entre ces deux stades parasitaires sont : la taille (diminuée), le noyau (plus postérieur), les micronèmes (plus nombreux) et la présence de nombreux granules cytoplasmiques d'amylopectine.

#### 4.3. Oocystes et sporozoïtes

L'oocyste est émis dans le fécès sous forme diploïde et non sporulée de 10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre. Deux sporocystes apparaissent au bout de 5 jours environ de maturation dans l'environnement. Ils contiennent chacun 4 sporozoïtes dont la structure est comparable à celle du tachyzoïte, mais plus riche en micronèmes et en rhoptries.

### 5. STRUCTURE BIOCHIMIQUE DE *T. GONDII*

#### 5.1. Structure moléculaire

Elle est complexe, avec plus d'un millier de molécules. Parmi les plus importantes, on retiendra :

- 5 protéines majeures de surface : P43, P35, P23, P22 et surtout P30, protéine la plus abondante ( 5% du poids total de *T. gondii*).
- une vingtaine d'antigènes cytoplasmiques.
- une vingtaine d'antigènes excrétés.

L'ADN est regroupé en 10 chromosomes [11] lorsque le parasite est sous forme haploïde (ce qui est le cas pour les tachyzoïtes et les bradyzoïtes), la seule forme diploïde étant uniquement visible dans les oocystes non sporulés. La quantité d'ADN a été estimée à 0,096 pg d'ADN / génome haploïde [18]. Johnson et coll., après avoir purifié

l'ADN de *T. gondii*, ont déterminé le G-C%<sup>1</sup> des tachyzoïtes de la souche RH à 44,4% [42]. Après ces premiers travaux, plusieurs gènes de *T. gondii* ont été publiés et séquencés:

- le gène de la P 30 [10]
- le gène codant pour la P 28, protéine des granules denses [64]
- le gène codant pour la P 23, protéine de la surface du toxoplasme [15]
- le gène B1 [9]
- les gènes d'ADNr [43]
- le gène TGR1E [1]
- les gènes codants pour les  $\alpha$  et  $\beta$  tubulines [57].

Parmi toutes ces différentes séquences, dont la liste est loin d'être exhaustive, nous aurons l'occasion de revoir de manière plus approfondie, au cours du chapitre suivant, les 4 gènes utilisés dans les techniques de PCR.

## 5.2. Différences moléculaires entre les souches de *T. gondii*

La plupart des études moléculaires sur *T. gondii* ont été effectuées sur la même souche, la souche RH, isolée en 1939 et maintenue depuis dans tous les laboratoires travaillant sur le toxoplasme. Cependant, après étude isoenzymatique d'un certain nombre d'isolats de toxoplasmes provenant d'animaux ou de malades infectés, il est apparu qu'il existait des différences génétiques entre ces isolats [22]. Ces études isoenzymatiques ont permis de regrouper les souches en 8 zymodèmes, populations de parasites définies par les types isoenzymatiques de 6 enzymes (aspartate, aminotransférase, glucose phosphate isomérase, amylase, glutathion réductase, phosphatase acide, propionyl estérase).

Il existe une corrélation assez nette entre l'appartenance d'un isolat à un zymodème et la pathologie dont il est responsable chez la souris. Cependant cette corrélation n'est pas retrouvée dans le cadre de la pathologie toxoplasmique chez l'homme (dans un même zymodème sont retrouvées des souches isolées de toxoplasmoses congénitales sévères ou de toxoplasmoses congénitales asymptomatiques, ou encore d'encéphalite toxoplasmique chez des sujets HIV).

Néanmoins ces différences intra-spécifiques peuvent faire craindre des différences au niveau de la séquence des gènes.

---

<sup>1</sup>G-C% : contenu en Guanine- Cytosine

En effet, des études directes du génôme (par des techniques de RFLP<sup>2</sup>) ont confirmé la grande variabilité des souches de toxoplasmes [19].

## 6. ÉVOLUTION D'UNE INFECTION TOXOPLASMIQUE

Les tachyzoïtes, disséminés dans tout l'organisme, vont envahir les cellules, car *T. gondii* est un protozoaire endocellulaire obligatoire: il dépend pour sa survie d'une cellule hôte

### 6.1. Évolution du parasite au sein de l'organisme

Une fois la pénétration du tachyzoïte effectuée, la synthèse d'ADN peut commencer et donnera 8-32 cellules filles. À ce stade, la cellule hôte se désintègre par compétition avec les éléments cellulaires vitaux [36], et/ou par sortie active lésant de manière irréversible la membrane cellulaire [34].

Les premiers bradyzoïtes apparaissent tôt (en 3 à 5 jours chez la souris). Ils sont contenus dans des kystes, développés à partir de la vacuole parasitophore et indépendants des tissus voisins. Cette paroi assure une barrière protectrice vis à vis de l'action des anticorps et permet les échanges. À l'intérieur, les bradyzoïtes continuent à se multiplier pendant plusieurs mois par phénomène d'endodyogénie. L'apparition des kystes est favorisée de manière indéniable par la pression de l'immunité qui se développe, mais aussi par d'autres facteurs, mal connus, puisqu'on peut retrouver ces éléments parasitaires dans les cultures cellulaires.

Le kyste, qui va augmenter de taille pendant plusieurs mois, est bien toléré. Il persiste pendant toute la vie de la cellule hôte.

### 6.2. Immunité antitoxoplasmique

On distingue chez le sujet immunocompétent trois phases :

- *La phase aiguë* : les tachyzoïtes se multiplient et se disséminent sans rencontrer de résistance.
- *La phase intermédiaire* : coexistence des premiers kystes avec les tachyzoïtes.

---

<sup>2</sup> RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

- la phase latente : kystes quiescents, bien tolérés puisque aucune réaction inflammatoire ne les entoure.

### 6.2.1. La réponse humorale

Elle vise au départ un antigène de la surface du parasite, la protéine P30. Ce n'est pas la seule molécule reconnue mais elle entraîne une réponse précoce et sera donc fréquemment utilisée en sérologie.

Les premiers anticorps à apparaître sont : IgM, IgE, IgA puis les IgG. Bien que *T. gondii* soit lysé par les anticorps en présence de complément, lorsqu'il est extracellulaire, cette réponse humorale ne joue pas un rôle majeur dans l'immunité anti-toxoplasmique [36]. En effet, la transfusion d'anticorps chez la souris ne protège pas celle-ci contre l'infection .

### 6.2.2. La réponse cellulaire

Son importance capitale a été prouvée par l'inoculation de *T. gondii* à des souris athymiques : ces dernières n'ont jamais développé d'immunité protectrice [36].

Cette expérience a été suivie de nombreuses autres permettant de démontrer le rôle majeur des lymphocytes T, des macrophages et des cytokines (dont l'interféron gamma) dans l'apparition d'une réponse protectrice.

À ce stade, la remarquable capacité d'adaptation de *T. gondii* lui permet d'échapper à la destruction en se mettant à l'abri dans les kystes. On aboutit alors à un état de prémunition avec persistance d'un parasite quiescent, parfaitement toléré par l'organisme, mais prêt à se réveiller en cas de baisse de l'immunité cellulaire et d'effondrement du taux de CD4 (HIV).

## **7. ASPECTS CLINIQUES DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE**

### **7.1. Toxoplasmose acquise asymptomatique**

Elle représente plus de 80% des cas [58] de toxoplasmose (d'où l'intérêt de la surveillance sérologique des femmes enceintes).

### **7.2. Toxoplasmose symptomatique du sujet immunocompétent**

#### **7.2.1. Forme classique**

Elle associe, après quelques jours d'incubation un syndrome mononucléosique, des adénopathies, une asthénie et éventuellement un discret énanthème et un fébricule.

L'évolution est spontanément favorable avec la disparition des adénopathies et de l'asthénie en quelques semaines ou mois.

#### **7.2.2. Forme grave**

Exceptionnellement, certains sujets non immunodéprimés peuvent présenter des manifestations graves de toxoplasmose avec atteinte pulmonaire, neurologique, ou oculaire. L'évolution est parfois mortelle.

#### **7.2.3. Forme récurrente**

Un autre aspect particulier est celui de la toxoplasmose "récurrente" du sujet immunocompétent. Ce sont, le plus souvent, des manifestations à type d'adénopathie, asthénie, et parfois troubles neurologiques.

Un cas, en particulier, a été rapporté par NORBY et EILARD [58] avec des manifestations neurologiques associées à des titres sérologiques très élevés avec persistance d'IgM et d'IgA.

### 7.3. Toxoplasmose de l'immunodéprimé

Elle est observée dans diverses situations d'immunodépression touchant plus particulièrement l'immunité cellulaire :

- sujets transplantés ou greffés à partir d'un donneur infecté.
- sujets soumis à un traitement immunosuppresseur.
- sujets VIH avec un taux de CD4 inférieur à 200/mm<sup>3</sup>.

Dans les deux derniers cas, il s'agit le plus souvent d'une réactivation endogène de parasite, rarement d'une primo-infection.

Chez les sujets VIH, très étudiés à l'heure actuelle, on retrouve une toxoplasmose active dans 3 à 10% des cas aux USA, dans 25 à 50% des cas en Europe [51]. C'est, en France, la deuxième infection opportuniste parasitaire après la pneumocystose [66].

#### 7.3.1. Toxoplasmose cérébrale (TC)

Elle représente plus de 50% des manifestations neurologiques du SIDA [34, 66]. Elle est toujours d'évolution fatale en l'absence de traitement. Les manifestations sont parfois insidieuses et inconstamment présentes [66]:

- fièvre (57,7% des cas).
- céphalées tenaces (46,5%) .
- troubles de la conscience (45,1%)
- atteinte neurologique focalisée (61,6%)  
hémiplégie, hémiparésie, atteinte des nerfs crâniens, syndrome cérébral, syndrome pyramidal,....
- crises convulsives (17,8%)

### 7.3.2. Toxoplasmoses extracérébrales (TEC) [40, 56, 65]

Au stade de SIDA, 1,5 à 2% des patients risquent de présenter une manifestation extracérébrale due à la toxoplasmosé[56]. De nombreuses localisations ont été décrites, parfois associées entre elles :

- œil: chorioretinite.
- poumon : image de pneumopathie interstitielle.
- moelle osseuse
- myocarde: tachycardie, tamponnade, insuffisance cardiaque..
- muscle
- foie
- vessie
- ganglions
- pancréas : pancréatite aiguë.
- peau
- parasitémie isolée

Ces manifestations extracérébrales seront suspectées devant la présence d'une fièvre (80% des malades [65]), de signes cliniques en rapport avec l'organe atteint précédemment décrit et l'absence d'un autre agent pathogène. Mais des cas de TEC ont été décrits associés à un autre maladie opportuniste.

Il y a parfois association de plusieurs localisations: toxoplasmosé "généralisée".

## 7.4. Toxoplasmose congénitale

### 7.4.1. Risques de contamination fœtale

Le risque pour une femme enceinte de se contaminer pendant la grossesse est évalué entre 0,4 et 1,6% [58]. Par ailleurs comme Thulliez et Desmonts l'ont souligné dans leur article [71], il existe toujours un délai plus ou moins long entre la contamination de la mère et celle de son enfant. Ceci est dû en grande partie au placenta qui joue un rôle de barrière: on aura ainsi une phase où le placenta sera infecté et le fœtus encore indemne. Cette barrière devenant de plus en plus perméable (par vieillissement et augmentation du débit sanguin) au fur et à mesure que la grossesse avance, le risque de contamination fœtale augmente et devient maximum au 3<sup>ème</sup> trimestre.

Une autre conséquence de cette contamination, si elle est différée, est l'atténuation de l'infection fœtale grâce aux anticorps transmis. L'enfant sera alors atteint d'une manière plus insidieuse et présentera un retard à sa propre immunisation.

	% d'infection fœtale en l'absence de traitement	% d'infection fœtale avec traitement
Antéconceptionnel	0%	***
Périsconceptionnel	1%	***
1 <sup>er</sup> trimestre	10-15%	4,5%
2 <sup>ème</sup> trimestre	30%	17,3%
3 <sup>ème</sup> trimestre	60 à 90%	28,9%

**Tableau réalisé d'après ceux de Wong et Remington [75] et Thulliez - Desmonts [71].**

En théorie, et d'après ce tableau, on retient que le risque fœtal est nul en cas de contamination maternelle antérieure au début de grossesse.

Quelques travaux ont cependant remis en question ce point [27] et ont démontré qu'une infection maternelle acquise avant la conception pouvait parfois être transmise au fœtus. Dans un cas, la grossesse avait débuté deux mois et demi après la séroconversion, sans que l'on retrouve de déficit immunitaire chez la mère et sans qu'il y ait d'IgM ou d'ascension des IgG en début de grossesse.

C'est pour cette raison que l'on recommande à une femme d'attendre six mois après la séroconversion avant de concevoir.

Dans le cas où la femme enceinte présente un risque d'immunodépression (lupus, maladie de Hodgking, splénectomie,...) il peut aussi y avoir récurrence ou parasitémie persistante. Chez ces sujets à risque, on sera particulièrement attentif à toute séroconversion antéconceptionnelle ou à tout signe de réactivation sérologique.

#### 7.4.2. Signes cliniques

##### 7.4.2.1. Forme asymptomatique à dépistage uniquement sérologique:

Elle reste grave car elle peut toujours évoluer vers une complication secondaire. Elle représente actuellement plus de 80% des cas.

##### 7.4.2.2. Forme symptomatique :

###### - Première moitié de la grossesse

- Mort in utero.
- Accouchement prématuré d'un enfant présentant une toxoplasmose polyviscérale nécrotique et hémorragique.

###### - Deuxième moitié de la grossesse :

- Atteinte neurologique pouvant associer : comitialité / méningoencéphalite / hydrocéphalie / microcéphalie parfois / troubles du tonus /...
- Atteinte oculaire : chorioretinite / microphthalmie / cataracte.

Ces formes graves évoluent souvent vers un important retard psychomoteur.

###### - Forme monosymptomatique :

- atteinte neurologique ou chorioretinite isolée

## 7.5. Toxoplasmose oculaire

C'est la cause la plus fréquente des chorioretinites chez le sujet immunocompétent (30 à 50% des uvéites postérieures) [4], d'origine congénitale le plus souvent.

C'est aussi la deuxième cause de rétinite au cours du SIDA après le CMV [17], d'origine acquise cette fois.

### 7.5.1. Physiopathologie

Elle pourrait faire intervenir différents phénomènes plus ou moins intriqués:[30, 70]

- Un effet toxique direct du parasite (primo invasion ou rupture d'un kyste) : on peut voir une nécrose extensive de la rétine causée par une multiplication parasitaire s'effectuant sans frein en l'absence de réponse immunitaire.
- Réaction inflammatoire à l'interface rétine/choroïde qui aboutit à l'arrêt de la prolifération du parasite (mais les produits libérés lèsent les cellules environnantes) .
- Emballement du système avec destruction plus ou moins étendue des tissus par mécanismes auto-immuns [30, 70]
- La conséquence de tous ces phénomènes : c'est un foyer cicatriciel entouré d'une pigmentation plus ou moins importante avec parfois une néovascularisation qui se greffe par-dessus.

### 7.5.2. Signes cliniques

Le malade consulte rarement pour la douleur, mais souvent pour troubles de la vision, chute de l'acuité visuelle, photophobie [6, 59].

Au fond d'œil, on pourra retrouver:

- Une uvéite postérieure et parfois antérieure.
- Un aspect évocateur : "plage blanc-jaunâtre, profonde, œdémateuse, à bord flous, peu hémorragique, accompagnée d'un flou vitréen prédominant en regard du foyer." [17]

*-Mais toute rétinite atypique doit faire évoquer le diagnostic chez l'immunodéprimé.*

## 8. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

### 8.1. Méthodes

#### 8.1.1. Mise en évidence directe du parasite

- **Inoculation du prélèvement** (liquide amniotique, sang fœtal,...):

- *Sur culture cellulaire* (fibroblastes humains).

Le parasite est recherché après quatre jours par immunofluorescence directe.

- *A la souris par voie intrapéritonéale*: mais le résultat est tardif (quatre semaines après l'infection), obtenu par surveillance sérologique des souris infectées.

- **Techniques de coloration et d'immunomarquage**

- *Étalement et coloration au Giemsa* des produits pathologiques.

- *Immunomarquage* (immunofluorescence directe, immunoperoxydase).

cette coloration peut se faire sur des fragments tissulaires et des liquides divers (exemple: liquide bronchoalvéolaire).

- **Détection des antigènes circulants toxoplasmiques**: les techniques manquant de sensibilité, elles sont rarement utilisées.

#### 8.1.2. Sérologie [25]

L'essentiel du diagnostic des infections toxoplasmiques repose sur la détection des anticorps. La multiplicité des techniques rend compte de la complexité de la réponse immunologique et des difficultés à apprécier l'évolutivité de l'infection.

### 8.1.2.1. TECHNIQUES DÉTECTANT DES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LES ANTIGÈNES MEMBRANAIRES (TECHNIQUES LES PLUS PRÉCOCES).

Ce sont les techniques les plus précoces et les plus sensibles.

Technique	Principe	Ac détectés	Avantages	Inconvénients
Test de Lyse (Sabin et Feldman, 1948) ou Dye test (Desmonts)	Lyse de toxoplasmes vivants	Tous : IgG++ IgM...	- Technique de référence par sa sensibilité et sa spécificité. - Positivation précoce (10 - 15 jours après la contamination - taux maximum en 2 mois - plateau à 6 - 12 mois). - Persistance d'un taux faible toute la vie (2 - 20 UI/ml).	- Nécessité d'entretien de toxoplasmes vivants en laboratoire. - Technique non automatisable et délicate.
Immuno fluorescence indirecte	Toxoplasmes fixés sur lame sur lesquels on fait agir le sérum à tester	IgG IgM	- Technique simple et peu coûteuse - Précocité et même évolution que le Dye test - Bonne sensibilité de détection des IgG (8 - 10 UI/ml) - Disparition précoce des IgM détectées	- Faux positifs en IgG si présence d'anticorps antinucléaires - Faux positifs en IgM : facteur rhumatoïde/ anticorps naturels. - Faux négatifs en IgM : excès d'IgG.
Agglutinaion directe classique	Réaction agglutination mettant en présence une suspension de toxoplasmes et le sérum à analyser (que l'on peut examiner avant et après 2ME <sup>3</sup> )	IgG IgM++	- Exécution facile / lecture simple - Sensible : - seuil : 1/4 - 1/8 très sensible aux IgM - Précocité : équivalente au DT - Datation précoce d'une séroconversion en association à une autre technique. - Disparition précoce des IgM (2 - 3 mois)	- Grande sensibilité aux anticorps naturels : faux positifs.
Agglutination hypersensibilisée	Suspension de toxoplasmes trypsinés et formolés que l'on fait réagir avec le sérum traité au 2ME	IgG	- Pas de détection des Ac naturels - Bonne sensibilité : seuil à 4 UI/ml	- Léger retard par rapport au DT
ISAGA Immunosorbent Agglutination Assay	Technique d'immuno capture	IgM ou IgA ou IgE	- Réaction simple non influencée par le facteur rhumatoïde - Sensible, précoce. - Spécifique ( les IgM naturelles ne sont responsables que d'un titre faible )	- Ce sont ceux d'une trop grande sensibilité: la détection des IgM est plus prolongée (6 mois à plusieurs années).

<sup>3</sup> 2ME : 2 Mercapto Éthanol qui sert à détruire les IgM.

### 8.1.2.2. TECHNIQUES DÉTECTANT LES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LES ANTIGÈNES SOLUBLES OBTENUS APRÈS LYSE DU TOXOPLASME

En règle générale, les anticorps dirigés contre ces antigènes sont d'apparition plus tardive, à moins d'enrichir la préparation de quelques antigènes membranaires. La sensibilité de la technique dépend donc beaucoup du fabricant du kit.

Technique	Principe	Ac détectés	Avantages	Inconvénients
Latex	Réaction d'agglutination de billes de latex sensibilisées en présence du sérum à tester	Tous : IgG IgM...	- Simple - Bien pour une technique de dépistage (détection d'anticorps totaux)	- Réaction soumise au "phénomène de zone", c'est à dire qu'une trop forte quantité d'immunoglobulines gêne l'agglutination (faux négatifs).
Hém-agglutination passive	Réaction d'hémagglutination de globules rouges sensibilisés en présence du sérum à tester.	Tous : IgG IgM	- Simple - Détection des anticorps totaux - Possibilité de détection des IgM en faisant une étude du sérum avant et après 2ME - Peu sensible aux anticorps naturels	- Positivité retardée (3 semaines après le début de l'infection) sauf si le fabricant a enrichi la préparation en antigènes membranaires - Nécessité de tester un témoin négatif (hématies non sensibilisées + sérum) afin d'éliminer une auto-hémagglutination.
ELISA direct	Réaction Immunoenzymatique	Surtout IgG	- Technique automatisable bien adaptée aux grandes séries - Lecture objective au spectrophotomètre.	- Sensibilité fonction de la qualité de l'antigène utilisé : positivation plus tardive que DT, IF, agglutination. - Pas d'expression possible en UI/ml, donc nécessité pour chaque laboratoire de donner sa valeur seuil en fonction du kit utilisé. - Faux positifs en IgM (facteur rhumatoïde, IgM naturelle). - Faux négatifs en IgM (excès d'IgG).
ELISA immunocapture	Réaction Immunoenzymatique	IgM ou IgA	- Technique automatisable - Lecture objective - Pas de compétition avec les IgG - pas d'influence du facteur rhumatoïde	- Difficile appréciation du seuil de sensibilité
ELIFA (Enzyme Linked Immuno Filtration Assay)	Coélectrosynérèse (les deux sérums à comparer étant la mère et le nouveau né) puis révélation des éventuels arcs de précipitation par immunoenzymologie	Tous : IgG IgM...	- Technique très sensible et très spécifique qui permet d'étudier la concentration comparée des anticorps et leur spécificité.	- Technique longue.

### 8.1.3. Calcul des charges immunitaires

Il sert à rechercher une production locale d'immunoglobulines

$$\frac{\left[ \text{IgG antitoxoplasme (UI/ml)} / \text{IgG totale (UI/mg)} \right] \text{ du compartiment étudié}}{\left[ \text{IgG antitoxoplasme (UI/ml)} / \text{IgG totale (UI/mg)} \right] \text{ du sérum}}$$

Si le rapport est supérieur à 3, on peut conclure à la synthèse locale d'anticorps.

Ses applications sont la recherche de la synthèse d'anticorps dans l'humeur aqueuse (HA), dans le LCR, chez le nouveau né.

### 8.1.4. La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) appliquée à la toxoplasmose.

Étant le but de notre travail, elle sera longuement développée dans le chapitre "PCR".

## 8.2. Conduite à tenir sur le plan paraclinique selon le diagnostic évoqué

### 8.2.1. Toxoplasmose congénitale [21]

#### - Diagnostic prénatal :

- échographie obstétricale à la recherche d'une dilatation des ventricules cérébraux / d'une hépatosplénomégalie / d'une ascite / d'une placentite.
- ponction de sang fœtal ( à partir de la 22<sup>ème</sup> SA ) et de liquide amniotique (dès la 14<sup>ème</sup> SA)

Sur le LA:

- recherche d'IgM spécifiques;
- inoculation à la souris et culture cellulaire.

Sur le SF:

- Inoculation à la souris et sur culture cellulaire.
- FNS : recherche d'une hyperleucocytose avec hyperéosinophilie (63% des cas) et présence de lymphocytes hyper basophiles.
- biochimie : augmentation des gamma GT et de la LDH (70% des cas).
- recherche d'IgM et d'IgA spécifiques.
- dosage des IgM totales (augmenté dans 63% des cas).

Les examens classiques permettent d'affirmer, avec une forte probabilité, l'infection fœtale. Ils ont néanmoins leurs limites :

- faux négatifs liés à la sensibilité insuffisante des techniques usuelles, en particulier si seule une amniocentèse est effectuée.
- retard au diagnostic avec l' inoculation à la souris (4 semaines), préjudiciable si un traitement actif ou un avortement doit être décidé.
- risque lié à la ponction de sang fœtal.

Ces raisons expliquent la nécessité de développer sur le prélèvement le moins invasif (amniocentèse) des techniques de diagnostic biologique plus sensibles que la culture cellulaire et plus rapides que l'inoculation à la souris.

- **A la naissance :**

- **radio du crâne** à la recherche de calcifications cérébrales
- **échographie transfontanellaire**
- **EEG**
- **fond d'œil**
- **prélèvement du sang de cordon :**
  - inoculation du sang de cordon à la souris.
  - détection des IgM spécifiques, des IgA spécifiques
  - comparaison des charges immunitaires de la mère et de l'enfant.
- **prélèvement du placenta**
  - inoculation à la souris.

Si tout le bilan précédent est négatif il faut envisager une surveillance sérologique et clinique régulière jusqu'à disparition éventuelle des anticorps.

*L'absence d'infection se traduit par :*

la décroissance régulière des IgG

la charge immunitaire qui diminue franchement au bout d'un à deux mois.

*L'infection se traduit par :*

la charge immunitaire qui reste stable ou augmente après avoir baissé suite à un traitement spécifique.

### **8.2.2. Toxoplasmose oculaire**

- **Fond d'œil** : son aspect évocateur oriente d'emblée le diagnostic.
- **Sérologie** : confirme l'immunité anti toxoplasmique
- **Ponction d'humeur aqueuse (HA)**
  - Permet la recherche des IgG spécifiques et non spécifiques.
  - Permet le calcul du coefficient de Desmonts (CD) :  
Charge immunitaire de l'HA / Charge immunitaire sérum.
    - Si le coefficient est supérieur à 4 : toxoplasmose oculaire certaine
    - Si  $2 < \text{coefficient} < 4$  : toxoplasmose possible.
    - Si le coefficient est  $\leq 2$  : toxoplasmose oculaire improbable.

Le coefficient de Desmonts appliqué à l'humeur aqueuse ne permet de conforter par une preuve biologique le diagnostic clinique de toxoplasmose oculaire que dans environ 44% des cas [4, 5, 8, 13]. Ce manque de sensibilité peut s'expliquer par l'absence de synthèse locale d'anticorps ou par la trop forte proportion d'IgG transsudée à partir du sérum lorsque le prélèvement est fait en période aiguë de l'inflammation choroïdo-rétinienne. Le diagnostic est donc encore souvent basé sur l'aspect clinique, les antécédents éventuellement connus de toxoplasmose congénitale, et sur la réponse au traitement.

Au cours d'un état d'immunodépression, le diagnostic différentiel avec une infection rétinienne à CMV peut se poser.

Dans tous ces cas, la recherche directe de toxoplasmes ou de l'ADN toxoplasmique par PCR apparaît comme un moyen de diagnostic supplémentaire intéressant [5].

### 8.2.3. Toxoplasmose de l'immunodéprimé

#### - Toxoplasmose cérébrale

- **Tomodensitométrie (TDM) et imagerie par résonance magnétique (IRM)**  
images uniques ou multiples, typiquement en anneau centré par une image hypodense prenant le contraste en périphérie [66]
- **Sérologie** : Elle est souvent de peu d'intérêt. En effet, la sérologie chez l'immunodéprimé est d'interprétation difficile [17] :
  - la majorité des sujets a une sérologie positive avec un titre d'anticorps modéré.
  - quelques uns présentent une augmentation du taux des IgG sans réapparition des IgM [26]. Chez un faible nombre de sujets, cette réactivation sérologique accompagne ou suit une toxoplasmose.
  - on voit rarement, mais cela a été décrit [65], une diminution voire même une négativation de la sérologie.
  - enfin, l'épisode de TEC ou de TC peut correspondre à une primo-infection.
- **Ponction lombaire** :
  - recherche d'une hyperalbuminorachie présente dans plus de 50% des cas [66].
  - recherche d'une hyperleucocytose à prédominance lymphocytaire (inconstante)
  - rapport des charges immunitaires entre LCR et sérum .
  - mise en culture du prélèvement (fibroblastes humains / souris).
  - recherche directe du parasite.

- **Biopsie cérébrale:**

Ses indications sont à peser en fonction de l'état clinique du malade et du bénéfice qu'il pourra en tirer.

En fait, en raison du peu d'apport des examens biologiques actuels, le diagnostic de TC se fait actuellement sur les aspects en TDM et la régression des troubles après traitement spécifique.

- **Toxoplasmose pulmonaire:**

- Mise en évidence du parasite ( par coloration, et/ou mise en culture, et/ou inoculation à la souris) dans les:

- lavages broncho alvéolaires (LBA)

- biopsies

## 9. TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE

### 9.1. Spécialités actives

#### 9.1.1. Macrolides et apparentés

- Spiramycine (Rovamycine®)

- Roxithromycine, azithromycine, clarithromycine : présentent des concentrations tissulaires et macrophagiques plus importantes.

- Lincosamides : essentiellement la clindamycine (Dalacine®) qui offre en plus une synergie avec la pyriméthamine (Malocide®).

Inconvénients :

- Aucune action parasiticide

- Aucune action sur les kystes; action uniquement inhibitrice, sauf peut-être la clindamycine qui diminuerait leur nombre [62].

Avantages :

- Bonne tolérance sauf la clindamycine (responsable de colites ulcéro-hémorragiques)
- Diminue le risque de transmission au fœtus

**9.1.2. Inhibiteurs de la synthèse des purines**

- **Antifoliques :**

- Sulfamides d'action rapide : sulfadiazine ( ou Adiazine<sup>®</sup>)
- Sulfamides semi-retard : cotrimoxazole (association du sulfaméthoxazole avec le triméthoprim : Bactrim<sup>®</sup>)
- Sulfamides retard : sulfadoxine commercialisée en association avec la pyriméthamine (Fansidar<sup>®</sup>).
- Sulfones : Disulone ( Dapsone<sup>®</sup>)

- Inconvénients :

- ceux des sulfamides : effets secondaires hématologiques et parfois cutanés.
- pas d'effet sur les kystes.
- déconseillé au premier et troisième trimestre de la grossesse.

- Avantages :

- association synergique avec le triméthoprim
- action parasiticide.

## - Antifolinique

### - Pyriméthamine (Malocide®)

Avantages : bonne diffusion tissulaire placentaire et méningée avec haute concentration cellulaire

- Triméthoprim : uniquement actif s'il est associé sous forme de cotrimoxazole.

Inconvénients :

- effets secondaires hématologiques et cutanés
- déconseillé au premier trimestre de la grossesse

### 9.1.3. Autres molécules

#### - Cyclines, quinolones :

- actives sur *T. gondii* mais leurs indications ne sont pas encore bien codifiées.

#### - Atovaquone (Wellvone®)

- active sur *Pneumocystis carinii* et sur *T. gondii*.
- en évaluation dans le traitement de la toxoplasmose chez le sujet HIV.

Avantage : efficacité relative sur les kystes toxoplasmiques

#### - Rôle des cytokines [34] :

- en particulier l'interleukine 1 et l'interféron gamma mais cela reste au stade expérimental.

## 9.2. Indications thérapeutiques

### 9.2.1. Toxoplasmose congénitale

#### Avant la naissance:

Séroconversion maternelle : Spiramycine 3 g/jour jusqu'à l'accouchement.

#### *Diagnostic anténatal négatif :*

- poursuite du traitement par la spiramycine

**Diagnostic anténatal positif :**

- interruption thérapeutique de grossesse.
- ou traitement plus actif
  - sulfadiazine 50 mg/kg/jour + pyriméthamine 1 mg/kg/jour + acide folinique
  - prescrits sous forme de cures de 3 semaines/trimestre en alternance avec la spiramycine [34]

**A la naissance :**

- *Si l'examen prénatal était négatif* : poursuite du traitement par Spiramycine (50000 U/kg/8 h) de la naissance à la disparition des anticorps.

- *Si l'examen prénatal était positif ou si l'enfant se révèle contaminé* :

100 mg/kg/jour de Sulfadiazine (ou Sulfadoxine) + 0,75 à 1 mg/kg/jour de Pyriméthamine + acide folinique en cure de 3 semaines par trimestre, en alternance avec la Spiramycine, depuis la naissance jusqu'à avoir la certitude d'une stabilité biologique et clinique. Le traitement sera reconduit en cas de reprise évolutive.

**9.2.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé**

D'après Leport et coll. [47], on donnera :

en première intention :

Pyriméthamine 1 mg/kg/jour + Sulfadiazine 100 mg/kg/jour.

en deuxième intention :

Pyriméthamine 1 mg/kg/jour + Clindamycine  $\geq 2,4$  g/jour.

D'autres schémas peuvent être utilisés, mais sont moins bien évalués :

- Pyriméthamine 1 mg/kg/jour + Clarithromycine 2g/jour.

- D'autres possibilités comportent

Disulone 50 à 100 mg/jour

Atovaquone 750 mg fois 4 /jour

Le traitement d'attaque dure environ 65 jours mais il sera suivi d'une prophylaxie secondaire à vie dans le SIDA, ou jusqu'à disparition de l'immunodépression dans les autres cas.

### **9.2.3. Toxoplasmose oculaire**

Elle suit les mêmes associations :

Pyriméthamine + Sulfadiazine

ou Pyriméthamine + Clindamycine

avec en plus une corticothérapie.



## LA PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) ou réaction de polymérisation en chaîne.

### 1. GÉNÉRALITÉS SUR LA PCR

#### 1.1. Bref rappel sur l'ADN

Depuis 1944 et les travaux d'Avery, MacLeod, et MacCarthy, on sait que l'ADN est le support moléculaire de l'information génétique.

Il a fallu attendre quelques années de plus (1953) pour que Watson et Crick démontrent que cette molécule est formée d'une double hélice constituée de l'enroulement de 2 chaînes polynucléotidiques antiparallèles 5' → 3' et 3' → 5'. Ces extrémités sont nommées 5' ou 3' d'après l'orientation des atomes de carbone 5' et 3' des noyaux de désoxyribose.

Ces 2 chaînes d'ADN s'apparient entre elles par des liaisons hydrogène entre leurs bases (Adénine [A] -Thymidine [T]; Guanine [G] -Cytosine [C]).

Un nucléotide est formé de l'union d'une base (Adénine, Guanine, Cytosine, Thymidine) avec le désoxyribose 5' phosphate.

Dans l'ARN la Thymidine est remplacée par l'Uracile [U] et le désoxyribose 5' phosphate par le ribose 5' phosphate.

Un oligonucléotide est un produit synthétique constitué d'une courte succession de nucléotides.

#### 1.2. Définition de la PCR

"Amplification élective d'une séquence d'ADN double brin, effectuée in vitro par extension itérative de 2 amorces, situées de part et d'autre de la région considérée, grâce à une ADN-polymérase. L'amplification est effectuée par la répétition de cycles de dénaturation / hybridation / extension qui assure une duplication exponentielle de chaque brin" [44].

Depuis sa création en 1985 par K. Mullis, elle a connu un succès grandissant. Ce succès est en partie dû à l'automatisation rendue

possible par la découverte d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées, et en partie au fait que la technique permet l'obtention d'une grande quantité d'ADN amplifié à partir d'une faible quantité d'ADN cible (on évite ainsi les techniques de clonage et d'analyse des clones, techniques longues et fastidieuses).

### 1.3. Principe

Il repose sur l'utilisation d'un couple d'amorces oligonucléotidiques de synthèse qui sont complémentaires d'une brève séquence du segment d'ADN que l'on veut amplifier.

Ces amorces vont encadrer leur ADN cible, l'une sur le brin "positif", l'autre sur le brin "négatif" lors de l'étape d'hybridation. Puis, au moment de l'extension, l'ADN polymérase (Taq polymérase) permettra la synthèse de l'ADN que l'on veut révéler.

#### - Les différentes étapes (cf schéma page 44)

##### - Première étape :

Temps de dénaturation à 95° de l'ADN double brin en 2 ADN simple brin.

##### - Deuxième étape :

Temps d'hybridation des amorces avec leur ADN complémentaire; la température d'hybridation, supérieure à 40°C, est fonction de la composition en oligonucléotides de la séquence cible (c'est à dire le rapport CG/AT).

À cette étape, les amorces seront en excès dans le milieu, afin de permettre une compétition entre l'hybridation et le réappariement des brins d'ADN provoqué par la chute de la température.

##### - Troisième étape :

Extension des chaînes complémentaires de l'ADN à partir des amorces grâce à la Taq Polymérase dont l'activité est maximale pour une température de 72°C.

Chacune des trois étapes dure en général moins d'une minute.

Chaque cycle produit un doublement de la séquence entre les 2 amorces. L'amplification est exponentielle : n cycles donnent  $2^n$  exemplaires de la cible choisie. En théorie seulement car, en pratique,

le rendement est moindre. En effet, on s'aperçoit que si les 18 premiers cycles sont bien exponentiels, au delà, la courbe tend vers un plateau atteint vers le 30<sup>ème</sup> cycle. Les raisons invoquées sont :

- l'inactivation partielle de l'enzyme.
- la consommation de nucléotides.
- la compétition entre les amorces et les brins néosynthétisés.
- la dimérisation des amorces.
- une apparition de sous-produits de réaction ayant un pouvoir inhibiteur.

Donc, dans la pratique, le rendement est beaucoup plus faible (environ 85% à chaque cycle) [73].

Remarque :

- En observant le schéma, on s'aperçoit que, pendant les premières étapes, des produits plus longs que la séquence cible exacte sont amplifiés. Ce phénomène gêne peu, en définitive, car les amplifications successives vont "sélectionner" la séquence cible exacte. Les produits moins spécifiques du départ étant progressivement "dilués" au milieu des séquences spécifiques.

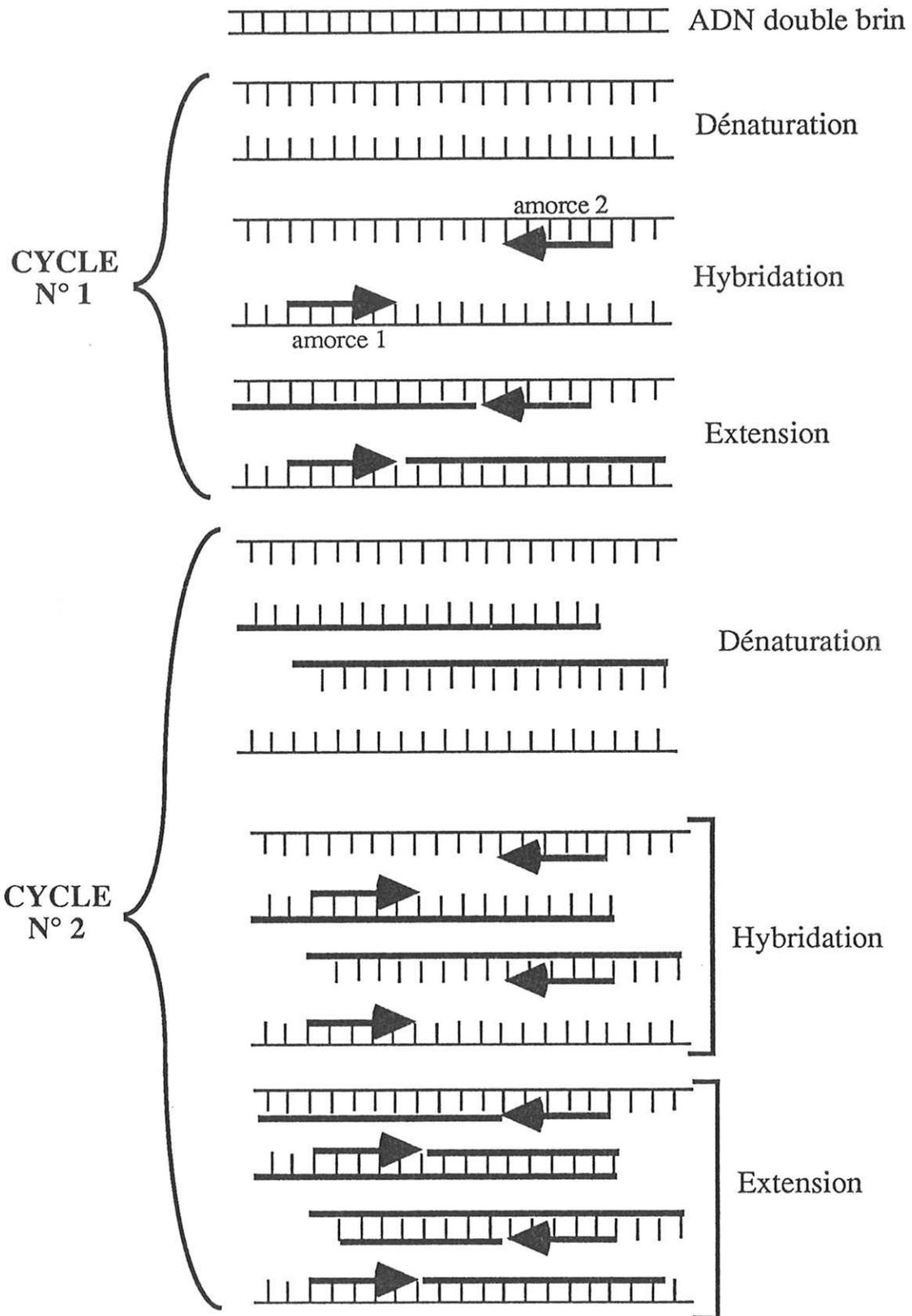


Schéma de l'amplification de l'ADN dans la PCR

### 1.3.1. Les composants de la réaction PCR [39, 44, 48, 73]

Chaque élément de la réaction a son importance. Toute variation de concentration risque de perturber la réaction (absence d'amplification ou amplification parasite)

- **L'ADN :**

Il doit être parfaitement purifié c'est à dire débarrassé des protéines qui sont, comme nous le verront plus loin des inhibiteurs.

La quantité d'ADN nécessaire à une amplification est de l'ordre de 1  $\mu$ g/microtube voire, à l'heure actuelle, moins.

- **La Taq DNA polymérase**

C'est une ADN polymérase thermo résistante, isolée à partir d'une bactérie thermophile vivant dans les mers chaudes "Thermus aquaticus" qui résiste à des températures atteignant les 94°C.[54]

Le rôle de l'ADN polymérase est de "catalyser" la réaction de réplication de l'ADN.Elle fonctionne exclusivement dans le sens 5'→ 3'. Cette réaction, pour débuter, nécessite un court segment d'ADN double brin (constitué ici du brin d'ADN mère couplé à une amorce) et des nucléotides triphosphates.

- De nombreuses Taq polymérases sont actuellement disponibles sur le marché, clonées. Elles doivent normalement présenter une grande stabilité thermique [39] pour assurer une bonne fidélité de la réaction. Mais en fait, la qualité est très variable selon les fabricants. La quantité d'enzyme utile pour 50 à 100  $\mu$ l de réaction varie entre 1 et 2,5 U.

- **Les nucléotides triphosphates (dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**, chacun à la concentration de 200  $\mu$ mol dans le milieu réactionnel. Ils vont servir de "briques" à la construction du brin d'ADN complémentaire par la Taq polymérase.

- **Les amorces ou oligonucléotides ou primers**

- Ce sont de courts segments d'ADN simple brin destinés à encadrer la séquence cible. Leur longueur idéale doit se rapprocher d'une vingtaine de bases (entre 16 et 24) [53].

- Les températures d'hybridation des 2 amorces nécessaires pour une réaction doivent être voisines pour permettre l'amplification en parallèle des 2 segments d'ADN et leur séquence doit être choisie de

manière à ne pas permettre la formation d'épingles à cheveux, ni d'hybrides entre amorces.

- **La séquence d'ADN à amplifier**

- À l'heure actuelle, en fonction d'une séquence donnée à reconnaître, il existe des programmes informatiques qui permettent de déterminer la séquence la mieux appropriée à l'amplification recherchée.

- La taille du fragment à amplifier ne doit pas être trop grande (en dessous de 800 paires de bases, le rendement est meilleur).

- **La concentration en magnésium :**

- Elle est importante car elle permet l'activité de la Taq polymérase, et doit atteindre des valeurs de l'ordre de 1,5 mmol. Il sera parfois utile d'augmenter cette concentration si l'on est en présence de chélateurs (type EDTA) [44, 48]

- **Le pH:**

- Il doit rester constant pendant la durée de la réaction enzymatique (tris HCl à un pH compris entre 8,3 et 8,8) comme dans toute réaction enzymatique.

- **La concentration en KCl :**

- Elle favorise l'appariement des amorces, mais à trop forte concentration, elle inhibe la Taq polymérase [39, 44]. On retiendra en règle générale un compromis à 50 mmol de KCl.

### 1.3.2. Les principaux problèmes courants de la PCR

- **Les inhibiteurs de la réaction PCR**

- Les plus connus sont l'héparine et les protéines, mais il en existe de nombreux autres. HARAS et AMOROS [39] en ont testé 6 :

- Éthanol  $\geq 3\%$
    - Urée  $\geq 0,5$  M
    - DMSO  $\geq 1\%$
    - DMF  $\geq 5\%$
    - Formamide  $\geq 10\%$
    - SDS  $\geq 0,001\%$

D'autres inhibiteurs, présents dans des produits pathologiques, ne sont pas encore identifiés.

Pour pallier à ce problème, des contrôles internes ou externes ont été mis en place.

Contrôle externe : on vérifie que l'ADN extrait est bien amplifiable en réalisant une deuxième PCR avec d'autres amorces. La cible est choisie pour sa présence certaine au sein de l'échantillon : gènes HLA ou gène de la bêtaglobine.

Contrôle interne : une deuxième cible est ajoutée au produit qui va être amplifié. La PCR qui se déroulera alors peut être compétitive [41]. Dans ce cas, elle peut déboucher sur une technique quantitative de PCR [61].

#### **- La contamination :**

C'est un problème majeur et fréquent du fait de la très grande sensibilité de la technique. Il expose à des faux positifs.

La source principale de contamination est constituée par les "amplicons" c'est à dire l'ADN amplifié au cours des cycles précédents qui risque de se volatiliser par aérosol lors de l'ouverture du tube réactionnel, souillant ainsi matériel, pièce et échantillons voisins.

Quelques mesures simples, mais draconiennes permettent de s'affranchir de ce problème [46]

- manipuler dans des pièces séparées, lors des différents temps de la préparation de la PCR, chaque lieu ayant son matériel approprié (pipettes, filtres, verrerie, etc...). L'amplification et la migration, en particulier, auront lieu dans des pièces distinctes.
- Aliquoter les tampons et tous les produits qui peuvent l'être, et autoclaver les solutions qui le supportent (l'autoclavage dégrade l'ADN à un très bas poids moléculaire).
- Utiliser des gants, les changer au moindre doute de souillure et entre chaque prélèvement.
- Utiliser des microtubes stériles s'ouvrant facilement mais très étanches.
- Utiliser des pipettes à pression positive ou des pointes protégées par un filtre.

- Toujours travailler encadré par un contrôle positif et un contrôle négatif (ce qui permet de tester la validité de la réaction et l'absence de contamination des réactifs).
- Chaque PCR positive doit, dans la mesure où cela est possible, être testée 2 fois avant de rendre un résultat définitif.
- Décontaminer les surfaces de travail de l'ADN.
  - HCl 1M
  - Lampe à UV.
- Utiliser des "protocoles d'inactivation" [31, 68]
  - Un des plus utilisés est le protocole Uracyl N Glycosylase (UNG) [44, 49] qui nécessite de remplacer les bases T par les bases U lors de l'apport de nucléotides dans la préparation de la PCR. Les produits amplifiés différeront donc de l'ADN natif par ces bases U sans que cela influe sur le déroulement de la réaction.  
Une étape en début de cycle est alors ajoutée : l'incubation de l'UNG avec les réactifs de la PCR, incubation qui va permettre à l'enzyme de dégrader tout l'ADN provenant d'une amplification antérieure. L'UNG est ensuite détruite par les fortes températures des cycles suivants et ne perturbe pas les produits d'amplification.
  - Un autre protocole d'Inactivation Photochimique à l'isosporalène (IP) existe [63]. L'IP est ajouté à la préparation de PCR; il est thermostable et interfère peu avec la réaction. Après la réaction, les microtubes sont exposés aux UV, ce qui active l'IP qui forme des liaisons covalentes entre les résidus thymidines des produits d'amplification. De ce fait, ces amplicons ne seront plus utilisables pour une réaction ultérieure.

Mais il faut souligner qu'aucune de ces deux techniques n'est fiable à 100% car :

- L'UNG peut laisser passer des amplicons contaminants et peut également être responsable d'une baisse de sensibilité de la technique par destruction des nouveaux produits formés à la fin de la PCR.

- L'IP présente les mêmes inconvénients, non pas par destruction des segments amplifiés, mais par modification de la charge électrophorétique du produit amplifié.

C'est l'expérience, les tâtonnements de chacun, la composition du produit final et son GC% qui permettent de déterminer quelle est la technique la mieux adaptée. **De toute manière, c'est l'ensemble de toutes les méthodes précédemment décrites qui permettra de réduire les problèmes de contamination.**

### **1.3.3. La révélation de la réaction**

#### **- Electrophorèse sur gel d'agarose ou sur gel de polyacrylamide**

Après migration électrophorétique, on visualisera le fragment amplifié grâce au bromure d'éthidium. Ce produit a la propriété de s'intercaler entre les bases d'ADN et de donner une fluorescence orange sous la lumière UV. Le segment amplifié sera repéré par rapport à des marqueurs de segments d'ADN de divers poids moléculaires qui auront été mis à migrer dans le même gel d'électrophorèse.

#### **- Dot Blot**

Après la PCR, on dépose un échantillon du produit amplifié sur un filtre et on révèle à l'aide d'une sonde marquée la présence éventuelle d'un amplicon.

#### **- Southern blot suivie d'une hybridation moléculaire**

Elle peut faire suite à l'électrophorèse, et se décompose en plusieurs étapes :

- Transfert de l'ADN sur une membrane de nylon par la méthode du Southern-Blot (16 heures environ).
- Préhybridation de la membrane.
- Hybridation de la membrane avec une sonde froide (marquée à la Biotine ou à la Digoxigénine) ou avec une sonde radioactive.

Cette méthode a l'avantage d'augmenter encore la sensibilité d'une simple PCR. Par contre, c'est une technique lourde, rallongeant l'examen de 72 heures ( contre 24 heures pour une simple PCR ).

#### - "Nested PCR"

C'est aussi une technique destinée à augmenter la sensibilité d'une simple PCR. Elle consiste en une 2<sup>ème</sup> PCR visant à réamplifier une partie interne de l'amplicon précédemment obtenu.

### 1.4. Les applications générales de la PCR

Elles sont multiples [39, 48] :

- La recherche fondamentale
- Le diagnostic virologique, bactériologique, parasitologique
- Les études de maladies génétiques
- La cancérologie.
- La médecine légale.
- La paléontologie....

## 2. APPLICATION DE LA PCR À LA TOXOPLASMOSE

### 2.1. Les différentes cibles

Au cours de la première partie de cette thèse, nous avons vu la composition biochimique du parasite et les gènes principaux qui ont été étudiés. Parmi tous ceux-ci, quatre sont couramment utilisés comme segment amplifiable pour la PCR.

Les 3 premiers (B1, rDNA, TGR1E) ont été choisis pour leurs répétitions au sein du génome de *T.gondii*. Elles augmentent ainsi les chances de révéler le parasite puisqu'il existe déjà une amplification naturelle de la séquence au sein du génôme.

Le 4<sup>ème</sup>, le gène de la P 30, est, lui, très spécifique, ce qui peut compenser sa présence en un seul exemplaire.

Un 5<sup>ème</sup> gène a été décrit, ABGTg 4, mais il reste peu utilisé à ce jour.

### 2.1.1. Le gène B1

Répété 35 fois dans le génome, son rôle exact est encore inconnu [10, 38, 72].

Le segment amplifié à partir de ce gène est composé de 223 paires de bases.

- Sa spécificité [38] :

Elle est bonne, puisque cette séquence a été retrouvée chez 21 souches de *T. Gondii*, et qu'il n'y avait pas de réaction croisée avec des coccidies voisines: *Sarcocystis* / *Neospora caninum* et d'autres micro-organismes comme *Plasmodium* / *Aspergillus* / *Candida* / *Cryptococcus* / *Absidia*.

- Sa sensibilité

Grover, dans ses conditions de travail, [38] arrive à détecter:

- 1 toxoplasme s'il est isolé dans le volume à tester.
- 10 toxoplasmes s'il est mélangé à 100 000 leucocytes dans le volume à tester.

Khalifa, lui détecte environ un parasite dans 1 µg d'ADN humain [45]

### 2.1.2. le gène rDNA

Ce gène code pour les ARN ribosomiaux 18S; il a l'avantage d'être répété plus de 100 fois dans le génome [5, 12].

- Sa spécificité :

- La constance du gène a été vérifiée sur plus de 40 souches de *T.gondii* [12].

- Il n'a pas d'homologie avec les autres espèces sauf avec les coccidies voisines (*Hammondia hammondi*, *Eimeria*).

- Sa sensibilité : [12, 14]

Les limites de détection sur l'ADN de toxoplasme purifié sont de:

- 50 fg (50.10<sup>-15</sup>g) d'ADN sans hybridation (soit moins d'un parasite, la quantité d'ADN contenu dans un tachyzoïte étant, on l'a vu, de 96 fg d'ADN [18])
- 1 fg d'ADN après hybridation (soit une copie de la cible).

### 2.1.3. Le gène TGR1E

- C'est une séquence répétitive anonyme du parasite qui a été clonée et séquencée par N. Christina et P. Ambroise-Thomas [1].

- Elle fait 353 paires de base

- Sa spécificité :

Il n'y a pas de croisement avec l'ADN d'origine humaine ou murine ni avec celui de *Pneumocystis carinii* ou de *Cryptococcus neoformans*.

- Sa sensibilité:

La limite de détection donnée par l'auteur pour la PCR réalisée selon ses conditions donne une valeur de 2 fg, soit 1/50<sup>ème</sup> de la quantité d'ADN génomique contenu dans un seul tachyzoïte [1].

### 2.1.4. Le gène de la P30

Isolé et séquencé par Burg, sa séquence est présente une seule fois dans le génôme du parasite [9].

- Son ARNm fait 1500 bases et représente environ 0,1% de l'ARNm total.
- L'ADN parasitaire a été détecté à la concentration de 100 fg après PCR, et à 50 fg après hybridation [74].

### 2.1.5. Le gène ABGTg 4

C'est un fragment de génome d'une longueur de 427 paires de bases répété environ 1000 fois dans le génome. À l'intérieur même du gène, une courte portion de 37 paires de bases est d'ailleurs répétée 2 fois.

La portion terminale d'ABGTg 4 présente une forte homologie (94%) avec 87 paires de bases de TGR1E.

- Sa sensibilité:

l'auteur, dans ses conditions, détecte le parasite dans le sang d'une souris dès le lendemain de l'inoculation [3].

- Sa spécificité:

Il n'y a pas de croisement avec l'ADN humain ou murin. Par contre, la spécificité ne semble pas avoir été déterminée vis à vis des coccidies voisines ou des germes fréquemment présents chez l'immunodéprimé.

## 2.2. Le déroulement de la réaction de PCR dans le cadre de la recherche de toxoplasmes

Il ne diffère pas sur le principe de la description donnée au début de ce chapitre.

**Les produits pathologiques testés** sont très variés; tout produit est a priori amplifiable pourvu que l'on dispose d'ADN pur, c'est à dire d'une technique d'extraction adaptée qui élimine les éventuels inhibiteurs présents.

**Cependant, on note de très nombreuses techniques qui diffèrent:**

- dans la préparation du tampon de lyse.,
- dans la technique d'extraction d'ADN utilisée.
- dans les séquences amorces choisies et le nombre de paires de base du produit d'amplification.
- dans l'utilisation des techniques de décontamination (certaines équipes n'en font pas mention).

- dans le mode de révélation ( PCR simple ou suivie d'une hybridation par Dot Blot ou Southern Blot à sonde soit chaude, soit froide, PCR suivie d'une "Nested PCR").

## **2.3. Étude des résultats publiés sur la PCR appliquée à la toxoplasmose**

### **2.3.1. Dans le cas d'une toxoplasmose oculaire:**

Voici résumé dans le tableau ci-dessous les quatres plus importantes séries de travaux réalisés sur l'apport de la PCR dans le diagnostic de la toxoplasmose oculaire à partir de prélèvements d'humeur aqueuse.

Dans les 3 premières séries présentées par les mêmes auteurs, la cible amplifiée est un fragment d'ADN ribosomal de 88 paires de base (pb) (gène rDNA).

	Nombre de cas	% positif en PCR	% positif avec le coeff. de Desmonts	% positif avec l'une ou l'autre	% positif avec l'une et l'autre
[5] <b>Aouizerate et coll.</b> Choriorétinite toxoplasmique probable et/ou CD $\geq$ 4 lors d'un contrôle précédent	23	7 [30%]	11 [43%]	16 [69%]	2 [9%]
Témoins négatifs (uvéïte antérieure ou postérieure non toxoplasmique)	8	0 [0%]	0 [0%]	0 [0%]	0 [0%]
[4] <b>Aouizerate et coll.</b> Lésions évolutives suspectes de toxoplasmose oculaire	15	5 [33%]	5 [33%]	9 [60%]	1 [7%]
Lésions cicatricielles ou CD $\geq$ 4 dans le passé sans inflammation détectable au moment de la nouvelle ponction	44	15 [34%]	22 [50%]	32 [72%]	5 [11%]
Témoins négatifs (uvéïte non toxoplasmique)	12	0 [0%]	0 [0%]	0 [0%]	0 [0%]
[13] <b>Cazenave et coll.</b> Toxoplasmose oculaire probable	65	25 [38%]	27 [41%]	38 [58%]	14 [21%]
Uvéïte non toxoplasmique	10	0 [0%]	0 [0%]	0 [0%]	0 [0%]
[8] <b>Brézin et coll.</b> Patients avec signes oculaires évocateurs de toxoplasmose oculaire	17	3 [17%]	10 [59%]	11 [65%]	2 [12%]

Au vu de ce tableau, certaines conclusions s'imposent :

- D'après ces travaux, absence de faux positifs en PCR.
- Présence de faux négatifs avec la PCR, qui peuvent être expliqués par plusieurs raisons :
  - La faible quantité de prélèvement mis à la disposition de la technique: l'ADN toxoplasmique peut ne pas être présent dans l'échantillon prélevé.

- La dissociation entre les deux techniques peut s'expliquer par:
  - la réponse inflammatoire qui peut avoir bloqué la dissémination du parasite (ce qui expliquerait que, en phase aiguë, on puisse avoir une PCR positive avec un CD négatif et qu'ensuite, le taux d'anticorps augmentant, le parasite soit éradiqué de l'humeur aqueuse) [4, 8].
  - Une autre possibilité serait de retrouver des tachyzoïtes dans l'humeur aqueuse sans qu'il y ait de réponse inflammatoire [4].

**Cette dissociation possible explique l'intérêt d'associer CD et PCR pour améliorer la valeur prédictive positive des examens dans le diagnostic de la toxoplasmose oculaire.**

Cette étude démontre enfin un point intéressant : le passage de *T. gondii* au niveau de l'humeur aqueuse. Le parasite ne semblerait donc pas exclusivement confiné à la chambre postérieure de l'œil. Cette présence de toxoplasmes dans la chambre antérieure de l'œil a d'ailleurs été confirmée dans une observation avec mise en évidence directe du parasite dans l'humeur aqueuse [55].

D'autres travaux ont retrouvé de l'ADN de *T. gondii* en des localisations plus attendues:

- Chi Chao CHAN [16] avait suspecté une toxoplasmose oculaire chez un patient présentant une leucémie lymphoïde chronique. Les signes avaient régressé sous pyriméthamine. Le diagnostic formel n'avait pu être obtenu qu'après autopsie, par analyse en PCR de coupes d'œil au niveau des lésions, à l'aide du gène B1.
- Manners [52] a rapporté le cas d'une femme immunocompétente qui présentait une nécrose rétinienne aiguë. Un échantillon de vitrée prélevé au cours de l'intervention chirurgicale et testé en PCR (gène B1) était revenu positif. On notera que, dans ce cas, le CD était limite.

### **2.3.2. Dans le cas d'une toxoplasmose congénitale:**

Voir tableau page suivante.

Echantillons testés	PCR positive et autre technique positive	PCR positive et autre technique négative	PCR négative et autre technique positive	Technique utilisée	Remarques
Cazenave et coll. [13]	80 LA 8 [10%]	2 [2%]	0 [0%]	2 PCR avec pour cible le gène rDNA suivie d'un Southern Blot et d'une hybridation	Les 2 LA positifs uniquement en PCR ont été confirmés au cours du suivi post-natal.
Grover et coll. [38]	48 LA 8 [17%]	0 [0%]	2 [4%]	2 PCR avec pour cible le gène B1 effectuées sur 2 échantillons à 2 dilutions différentes suivies d'une hybridation	- Il y a eu 6 autres signaux positifs en PCR, mais comme ils n'ont jamais été reproductibles, ils ont été considérés comme négatifs. Les 2 faux négatifs pourraient être expliqués par un LA très hémorragique.
Hohfeld et coll. [41]	339 LA 34 [10%]	3 [1%]	0 [0%]	2 PCR avec pour cible le gène B1 suivies d'une hybridation. A noter l'utilisation d'un contrôle interne permettant la vérification de l'absence de faux négatifs et l'approche d'une PCR semi quantitative. d'UNG (absence de faux positifs)	Dans les 3 cas où la PCR a été le seul examen positif, la toxo congénitale a été confirmée: - par l'autopsie dans 2 cas - par la surveillance sérologique post natale dans le 3ème cas. Il y a eu 13 cas où la PCR n'a pu être interprétée suite à la présence d'inhibiteurs.
Christina et coll. [20]	11 LA 15 F 0 [0%] [0%]	0 0 [0%] [0%]	2 0 [18%] [0%]	1 PCR avec pour cible le gène TGR1E suivie d'1 Southern Blot avec hybridation	Les échantillons qui ont été utilisés pour l'extraction étaient au départ prévus pour un examen histologique et fixés au Carnoy ; l'ADN n'a été ni déprotéinisé ni lysé, ce qui pourrait expliquer les 2 faux négatifs.
Dupouy-Carnet et coll. [28]	40 LA 12 SF 5 0 [12,5%] [0%]	2 0 [5%] [0%]	0 1 [0%] [8%]	1 PCR avec pour cible le gène P30 suivie d'une hybridation	Le faux négatif sur SF pourrait être un inconvénient de la sonde P30 très spécifique mais de moins bonne sensibilité en cas de faible parasitémie

Tableau récapitulatif des différents travaux sur l'intérêt de la PCR dans l'étude des LA et SF

1 Technique testée en parallèle à la PCR :  
 inoculation à la souris de LA ou de SF s'il y en a  
 culture cellulaire de LA ou de SF (s'il y en a)  
 recherche d'IgM sur SF  
 recherche de marqueurs non spécifiques

### **Conclusions**

- Il y a peu de faux positifs en s'entourant d'un certain nombre de contraintes (reproductibilité : 2 PCR positives au moins; UNG)

- Les deux faux négatifs retrouvés par Grover et coll. [38] présentaient probablement une parasitémie faible. D'autre part, s'il n'y avait qu'un très petit nombre de parasites, ceux-ci ont pu passer arbitrairement dans l'échantillon servant à l'inoculation. En effet :

- dans un cas l'inoculation du SF à la souris a été le seul positif; l'inoculation du liquide amniotique à la souris et la PCR sur celui-ci demeurant négatifs.

- dans l'autre cas, seule l'inoculation de liquide amniotique à la souris a été positive; l'inoculation du SF à la souris et la PCR sur le LA restant négatifs.

De plus, les deux prélèvements de liquide amniotique étaient très sanglants; l'hémoglobine a donc pu inhiber la PCR.

Les essais de PCR 1/2 quantitatives effectués par Hohlfeld et coll. [41] montrent qu'apparemment, de faibles valeurs en PCR sont corrélées à une faible sensibilité de l'inoculation à la souris.

**De toute façon, il n'y a aucune corrélation entre les résultats de la PCR 1/2 quantitative et le devenir du fœtus.**

À la vue de ces travaux, la PCR semble être d'un intérêt évident de part sa rapidité et sa sensibilité pour aider au diagnostic de toxoplasmose congénitale: **elle permet la mise en place plus rapide d'un choix thérapeutique.**

#### **2.3.3. Dans le cas d'une toxoplasmose chez l'immunodéprimé:**

Voici tout d'abord trois tableaux résumant les principaux travaux sur l'intérêt de la PCR dans l'étude des LCR / sang / LBA chez l'immunodéprimé.

Auteur Article	Nombre et qualité du prélèvement	Nombre de PCR positives	Nombre d'inoculations à la souris ou de cultures positives	Technique utilisée	Remarques
Gross et coll. [37]	28 LCR de sujets HIV	5 18%	4 1 NF <sup>1</sup>	Gène B1 suivie d'une hybridation	Régression sous traitement spécifique pour le 5 <sup>ème</sup> patient positif en PCR. L'inoculation à la souris n'a pas été faite
	7 LCR d'enfants non ID suspects de toxoplasmose congénitale	1 14%	0		Après le décès de l'enfant, l'examen cérébral a mis en évidence des kystes
Khalifa et coll. [45]	15 sangs de HIV stade SIDA avec preuves cliniques de TC	2 13%	1 6 NF	Gène B1 suivi d'une hybridation	1 PCR trouvée positive correspondait à l'inoculation positive.
	8 LCR de HIV stade SIDA avec preuves cliniques et paracliniques de TC.	3 37%	0 3 NF		
	9 sangs de patients ID (5 HIV, 4 greffes ou hémopathies) avec preuves cliniques et paracliniques de TEC.	4 3 NF	4 44%	En cas de résultat positif, la PCR sera refaite en ajoutant de l'UNG à la préparation	Chez 3 malades la PCR est revenue positive sur sang et ou dans le LBA après une semaine de traitement. Par contre, après 4 semaines, tout était négatif. Chez les sujets ID non HIV, le parasite n'a été retrouvé qu'une fois.
	6 LBA de patients ID (5 HIV, 4 greffes ou hémopathies) avec preuves cliniques et paracliniques de TEC.	6 100%	3 50%		
Cristina et coll. [20] <sup>2</sup>	87 LBA provenant de 83 HIV	4 5%	4 5%	Gène TGR1 suivi d'une hybridation	Les échantillons utilisés pour l'extraction étaient prévus au départ pour faire une histologie et fixés au Carnoy S'il n'y a pas eu d'inhibition de l'amplification, c'est probablement parce que le parasite était en assez grand nombre
	1 biopsie digestive d'un HIV	1	1		

<sup>1</sup> NF = Non Fait

<sup>2</sup> Dans cet article la technique comparative était constituée d'une Immunofluorescence directe et d'un Giemsa sur LBA

Auteur Article	Nombre et qualité du prélèvement	Nombre de PCR positives	Nombre d'inoculations à la souris ou de cultures positives	Technique utilisée	Remarques
Dupouy-Camet et coll. [29]	7 sangs de HIV avec culture positive (1 TC et 6 TEC)	6 85%	7 100%	PCR avec pour cible la P30, suivie d'une hybridation,	Etude rétrospective. 1 faux négatif.
	14 sangs de HIV suspects de TC	9 64%	1 7%	PCR positive si reproductible 2 fois/3	Etude prospective prélèvement obtenu avant tout TRT.
	17 sangs de témoins négatifs	0 0%	0 0%		
Roth et coll. [67]	47 LBA - 26 HIV - 17 greffes - 4 hémopathies	3 6,4%	NF	- 2 fois 2 couples d'amorces B1 - 1 couple d'amorces P30 - 1 <sup>ère</sup> PCR testée avec le 1 <sup>er</sup> couple B1 Si positive, testée avec le 2 <sup>ème</sup> couple B1, puis avec le couple P30	Les 3 cas positifs ont été confirmés par la clinique et la thérapeutique. Les PCR sur sang ont pu être effectuées dans 2 cas sur 3 Elles ont été, elles aussi, positives ( 1 des malades était d'ailleurs sous thérapeutique spécifique depuis 1 semaine)
	4 témoins négatifs : sujets non ID	0	NF		
Schoodermark-Vandeven et coll. [69]	30 LCR de 20 HIV suspects de toxoplasmose cérébrale.(scanner évocateur).	13 43%	NF	PCR avec le gène B1 suivie d'une hybridation soit par dot blot, soit par southern blot	Il y a eu 7 malades qui ont répondu favorablement au traitement spécifique dont 5 avec une PCR positive et 1 avec une PCR négative (les 6 autres patients avec 1 PCR positive n'ont pas été suivis).
	19 LCR provenant de 13 HIV sans signes neurologiques	0 0%	NF		
Bretagne et coll. [7]	107 LBA provenant de patients ID: - 42 HIV - 65 patients greffés ou cancéreux ou sous thérapeutique immunosuppressive	7 6,5% ->6 ->1	NF	2 PCR avec pour cible B1 certifiés par un contrôle interne et suivies d'une hybridation.	-- Tous les malades ID avaient des symptômes respiratoires ou 1 fièvre inexplicée. -- Sur les 7 PCR positives, 6 ont été confirmées par l'évolution ;1 a été perdu de vue.  -Le contrôle interne a permis d'éliminer 6 PCR qui présentaient des inhibiteurs.
	37 témoins négatifs non ID	0	NF		

Auteur Article	Nombre et qualité du prélèvement	Nombre de PCR positives	Nombre d'inoculations à la souris ou de cultures positives	Technique utilisée	Remarques
Angel et coll. [2]	5 LCR de sujets HIV positifs suspects de TC	4 80%	NF	PCR avec pour cible ABGTg4 suivie d'un dot blot	Sur les 4 malades présentant une PCR positive: --2 sont décédés peu après. --2 se sont améliorés sous traitement Le seul malade avec 1 PCR négative présentait une infection à mycobactérie atypique.
	1 LCR de témoin séronégatif pour la toxoplasmose	0	NF		
Filice et coll. [33]	5 sangs de HIV avec signes cliniques de toxoplasmose	3 60%	2 3 NF	PCR avec pour cible le gène B1 suivie d'une hybridation Le résultat est considéré comme positif, uniquement s'il est reproductible 2 fois	Un patient de ce groupe présentait une PCR positive malgré une sérologie négative.
	4 sangs de HIV avec fièvre non évocatrice de toxoplasmose	3 75%	NF		
	5 sangs de HIV avec TC ancienne traitée	0 0%	NF		
	Sang d'1 enfant présentant une toxoplasmose congénitale traitée.	0 0%	négative		
	22 témoins négatifs	0 0%	NF		
Farmley et coll. [32]	13 LCR de 9 patients HIV présentant des signes de TC	4 31%	NF	Extraction par ébullition à 94°C puis PCR avec le gène B1 suivi d'1 dot blot.	--3 malades avec une PCR positive ont bien répondu au traitement. Le 4 <sup>ème</sup> n'a pas été traité et sa PCR est revenue négative un mois plus tard (faux positif ou présence transitoire du parasite dans le LCR?) --3 patients avec une PCR négative se sont améliorés sous traitement.
	5 LCR de patients HIV ne présentant pas de signes de TC	0 0%	NF		
Ostergaard et coll. [60]	43 LCR de 38 HIV suspects de TC	8 18%	NF	2 PCR avec 2 gènes différents(B1 et rDNA) suivies d'une "nested PCR" et d'une hybridation.	-7 PCR positives était parfaitement en accord avec la clinique et la paraclinique. - La 8 <sup>ème</sup> a été considérée comme un faux positif car le malade présentait une sérologie toxoplasmique négative. Il est cependant décédé sous antibiothérapie non spécifique et montrait des lésions cérébrales compatibles avec une TC.
	14 LCR de sujets HIV négatifs	0	NF		

## EN CONCLUSION DES DONNÉES DES DIFFÉRENTS TRAVAUX ÉTUDIÉS, PLUSIEURS ÉLÉMENTS APPARAISSENT :

### 1) Disparité des prélèvements et des patients étudiés

Les rendements de la PCR varient énormément (de 5% à 100%) suivant les auteurs. Ceci est dû essentiellement à la grande hétérogénéité des populations étudiées ainsi qu'aux variations d'échantillons (par exemple, Cristina [20], avec 5% de positifs travaillait sur des LBA de patients HIV tout venant; Khalifa [45], avec 100% de positifs travaillait sur des patients chez lesquels les arguments cliniques et paracliniques étaient en faveur d'une toxoplasmose).

### 2) Disparité des techniques d'extraction Gross et all. ont testé 3 méthodes de préparation de l'ADN [37]

- la 1<sup>ère</sup> : faire bouillir la préparation de cellules de différents organes, technique qui a donné des résultats médiocres.
- les 2 autres (à la protéinase K et au thiocyanate de guanidium- silice), ont donné des résultats identiques sauf en ce qui concerne le traitement des biopsies (placenta, cerveau, adénopathies). La protéinase K donne alors de meilleurs résultats, en particulier sur le plan de la reproductibilité. Ceci souligne l'importance de la technique d'extraction à utiliser en fonction du prélèvement que l'on veut traiter.

### 3) Disparité des techniques d'amplification

D'après les tableaux précédents, il y a quelques grandes différences dans les techniques utilisées :

- Le gène auquel on fait le plus appel est le gène B1 (7/11),

Il est suivi des gènes

- P30 (2/11)
- ADNr (1/11)
- TGR1E (1/11)
- et le ABGTg4 (1/11), mais celui-ci n'a jamais été utilisé dans les LA et les SF.

#### 4) **Disparité des critères de positivité**

Une fois l'amplification réalisée, la PCR est le plus souvent doublée, voire même triplée et suivie d'une hybridation, le résultat n'étant rendu positif que lorsqu'il est reproductible.

Une évolution intéressante semble être le développement de témoins internes de réaction qui devraient diminuer le nombre de faux négatifs en signalant les échantillons souillés par des inhibiteurs.

#### 5) **Les limites de la PCR:**

##### **- le problème des faux négatifs (cf tableau page 65)**

Celui-ci peut avoir au moins 3 raisons

- l'absence de parasite dans l'échantillon testé
- la présence éventuelle d'inhibiteurs
- une faille dans la manipulation

##### **- le problème des faux positifs**

Il est beaucoup plus rarement rencontré, car les habitués de la technique s'entourent de nombreuses précautions. Il reste cependant surprenant que certains malades présentent une PCR positive bien qu'ayant une sérologie toxoplasmique négative.

- En dehors des problèmes de contamination, ne pourrait il pas s'agir d'une primo-infection chez des sujets très immunodéprimés ou bien d'une réactivation après négativation sérologique ? Seule l'autopsie permettrait de trancher dans ce cas.

- Une autre explication serait la sensibilité insuffisante de la technique sérologique utilisée. On a vu, en effet, dans la partie sérologie de notre premier chapitre, la multiplicité des examens utilisables, et leur différence en sensibilité.

#### **Remarque**

Les kystes donnent des résultats positifs en PCR avec le gène B1; on ne pourra donc pas faire la différence entre les tachyzoïtes (forme active, signant l'évolutivité de la toxoplasmose) et les bradyzoïtes (forme quiescente, présente chez tout sujet infecté chroniquement) au niveau d'un tissu.

## 6) Les effets du traitement sur la circulation parasitaire

Les différentes PCR effectuées chez des patients sous traitement spécifique de la toxoplasmose montrent que la parasitémie persiste jusqu'à 12 jours après le début de la thérapeutique [29]. Par contre, après 4 semaines, Khalifa [45] n'a plus retrouvé aucun positif. De plus, cette parasitémie est fluctuante, présente un jour, absente le lendemain, ce qui est probablement due

- à la faible circulation des trophozoïtes
- au fait que toutes les manifestations localisées de toxoplasmose ne donnent pas forcément lieu à une dissémination large du parasite.

La PCR apparaît surtout intéressante lorsqu'existent des localisations extra cérébrales de la toxoplasmose: PCR effectuée sur sang, sur LBA. La recherche d'ADN toxoplasmique par PCR donne, quand à elle, des résultats très inconstants sur les LCR.

Un autre élément intéressant à souligner est la négativité des PCR sur le sang et le LCR chez des sujets immunodéprimés ou non, ayant une toxoplasmose chronique. En effet, la persistance du parasite dans les tissus (sous forme de bradyzoïtes) et la possibilité de réactivation avec recirculation de parasites au cours de l'infection chronique a longtemps été évoquée comme une limitation à l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des toxoplasmoses évolutives.

## 8) Les différentes causes d'immunodépression :

Les sujets immunodéprimés, suite à une cause autre que le virus du SIDA, semblent moins touchés par les réactivations toxoplasmiques [7, 67] : une seule PCR positive sur 65 cas. Ceci est probablement dû au fait que leur immunité cellulaire reste, malgré tout, mieux conservée et qu'elle peut se restaurer plus rapidement en cas d'amélioration de la maladie sous jacente.

Voici résumé sur le tableau suivant la présence de faux négatifs ou de faux positifs en fonction des auteurs. On se base alors sur les prélèvements pathologiques suspects de toxoplasmose, et non pas sur les groupes témoins qui étaient tous exempts de faux négatifs ou de faux positifs.

	Faux négatifs	Faux positifs
	sur les prélèvements de LCR, sang, LBA chez l'ID	
Gross [37]	0	0
Cristina [20]	0	0
Khalifa [45]	oui	0
Dupouy-Camet [29]	oui	0
Filice [33]	oui	oui ?
Roth [67]	0	0
Schoondermark-Vandeven [69]	oui	oui ?
Bretagne [7]	0	0
Angel [2]	0	0
Ostergaard [60]	0	oui ?
Farmley [32]	oui	oui

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. MATÉRIEL

#### 1.1. Les patients

- 27 patients HIV positifs, présentant une sérologie toxoplasmique positive : étude de 30 prélèvements de sang (prélevés sur tube citraté ou avec EDTA).

Deux catégories :

- Sujets suspectés d'avoir fait ou de faire une toxoplasmose symptomatique (13 cas). On retrouve en particulier 5 cas de TC. Ce diagnostic est basé sur l'association de signes cliniques, images radiologiques et amélioration sous traitement.

- Sujets tout venant chez lesquels on recherche une parasitémie transitoire sans signes cliniques parlants (14 cas).

- Une enfant ayant une hémopathie maligne et présentant une séroconversion toxoplasmique (prélèvement de sang).

- Une patiente non immunodéprimée présentant une forme symptomatique grave et récidivante de toxoplasmose (prélèvement de sang).

- 12 femmes enceintes ayant présenté une séroconversion toxoplasmique au cours de leur grossesse et chez qui on a effectué une ponction de liquide amniotique (LA) et souvent de sang fœtal (SF). Nous avons analysé, au cours de ce travail les 12 LA en PCR.

- 5 Sujets consultant pour une chorioretinite évocatrice d'une toxoplasmose oculaire : étude de 5 ponctions d'humeur aqueuse.

Afin de faciliter la consultation des données, nous avons regroupé sur 6 tableaux (pages 67 à 72) quelques uns des principaux signes cliniques observés, la prophylaxie éventuelle prise, les traitements reçus et l'évolution de ces patients.

patients immunodéprimés présentant une toxoplasmose évolutive (2 pages)

Nom et date du prélèvement	Renseignements cliniques	Prophylaxie	traitement 1
B.E. P. 6/9/93	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HIV +</li> <li>- 20/1/93 : Suspicion de TC sur crise convulsive + image TDM</li> <li>- Régression complète des lésions au 2/93</li> <li>- 9/93 : TDM normale</li> </ul>		11/93 : Adiazine® Malocide® puis Malocide® Dapson®
22/11/93	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mais tr pris de façon épisodique</li> <li>- 19/11/93 : nouvelle crise comitiale + TDM pathologique avec lésion évolutive toujours dans la même zone cérébrale.</li> </ul>		Malocide® Dalacine® dès le 20/11/93
CO. J.-L. 22/11/93	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HIV +</li> <li>- 03/93 : Crise comitiale + image TDM : découverte d'une TC</li> <li>- 04/93 : persistance de l'image anormale qui disparaît en juillet 93</li> <li>- 11/93 : Aucun symptôme de toxoplasmose évolutive</li> <li>- décédé en 12/93 d'une perforation colique.</li> </ul>	Malocide® depuis 08/92	Malocide® - Adiazine® (arrêté en 11/93)
D.E. G. 22/11/93	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HIV +</li> <li>- 9/93 : fièvre / céphalée / déficit de l'hémicorps droit</li> <li>- TDM : fortement évocateur de TC</li> <li>- amélioration neurologique en quelques semaines sous traitement</li> <li>- TDM du 13/10 : normal - 22/11 : TDM toujours normal</li> <li>- Evolution : récurrence de TC le 30/12/93.</li> </ul>		Dalacine® - Malocide® puis Dalacine® - Adiazine puis arrêt du traitement pour problème d'intolérance
D.R. D. 17/01/1994	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HIV +</li> <li>- A partir du 21/12/93 : forte augmentation des sérologies toxoplasmiques - IRM normale</li> <li>- 12/93 : paralysie faciale a frigore</li> <li>- 17/1/94 : paralysie faciale en cours d'amélioration</li> <li>- 26/2/94 : diplopie faciale droite et gauche</li> <li>- Evolution : pas de signe en faveur d'une toxoplasmose</li> </ul>		Malocide® - Adiazine® quelque temps après le prélèvement malgré un taux de CD4 à 574/ mm <sup>3</sup>
F.O. M. 1/09/93	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suivi régulier pour perfusion d'immunoglobuline chez un patient HIV + présentant des adénopathies chroniques qui auraient augmenté de volume : séroconversion toxoplasmique découverte en 09/93 (sans retentissement clinique)</li> </ul>	Bactrim® depuis le 10/91	

1 traitement pris au moment où nous est parvenu le prélèvement.

Nom et date du prélèvement	Renseignements cliniques	Prophylaxie	traitement 1
FR. F. 9/12/93	- HIV + - Antécédents : réinite à CMV / pneumocystose / TC en 92 - 12/93 : IRM : séquelles de TC. Apyrétique.		Malocide® - Adiazine®
13/01/94	- HIV + - 1/94 : stade de leucoencéphalite multifocale avec crises convulsives - Décédée en 04/94 par encéphalopathie HIV.		
GA. H. 14/12/93	- HIV + - 12/93 : troubles de la vision avec photophobie - TDM normal, FO normal		
1/10/93	- Episode d'hépatite aigüe		
GI. Lu. 15/12/93	- HIV + - TDM cérébrale du 18/8/93 : image typique de toxo cérébrale - 17/12 : lésions séquentiales : pas d'évolutivité - Récidive le 18/1/94 suite à l'arrêt du traitement. - Décédé le 08/94 par encéphalopathie / CMV / toxoplasmosse.		Malocide® - Adiazine®
IL. M. 7/12/93	- Drépanocytose homozygote chez I HIV + - 12/93 : céphalées + asthénie. Toxo cérébrale ? - TDM cérébral normal - En fait l'épisode a été étiqueté crise vaso occlusive.		
MA. A. 2/02/94	- HIV + - Fièvre - Pneumopathie sans étiologie (Candida ?) - Aucune suspicion de toxoplasmosse		
SA. F. 22/11/93	- HIV + - Réinite à CMV bilatérale / pneumocystose / tuberculose pulmonaire.	Bactrim®	
VO. L. 1/94	- HIV + - Crise dépilepsie le 27/9/93 - PL normale - scanner normal - aucune suspicion de TC	Bactrim® depuis 07/92	
WI. P. 9/12/93	- HIV + - Encéphalopathie démentielle liée au VIH (scanner, IRM normaux)		
HE M 9/12/93	- LAMI depuis 93. La patiente a présenté une séroconversion toxoplasmique asymptomatique ( découverte d'un fort taux d'IgM lors du bilan initial)		Bactrim® puis Rovamycine®

1 traitement pris au moment où nous est parvenu le prélèvement.

## Un cas d'une patiente non ID suspecte de toxoplasmose récurrente

Nom et date du prélèvement	Renseignements cliniques	Prophylaxie	traitement <sup>1</sup>
L.I. M. 9/94	-En 87, toxoplasmose symptomatique traitée par Rovamycine®. Depuis, plusieurs récurrences (sans notion d'immunosuppression). En mars 94, devant la persistance de symptômes, de taux sérologiques élevés avec IgM et IgA persistantes, le reste du bilan restant négatif, décision de traitement.		3 cures de Malocide® Adiazine® de 3 semaines Au moment du prélèvement : 2ème cure

<sup>1</sup> traitement pris au moment où nous est parvenu le prélèvement.

## Patients ID non suspects de toxoplasmose évolutive

Nom et date du prélèvement	Renseignements cliniques	Prophylaxie	traitement <sup>1</sup>
AG. P. 15/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV	Bactrim®	
BR. A. 7/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
CU. M. 22/11/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV - Présente 1 thrombopénie majeure nécessitant 1 splénectomie		
CL. 26/01/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
DE. J.-P. 7/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
GI. La. 1/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
GU. B. 22/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
HU. C. 7/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
NZ. MA. D. X/12/92	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
PE. P. 14/12/94	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
PI. B. 22/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		
PI. J. 7/12/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV	Bactrim® depuis 01/93	
SA. C. 22/11/93	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV	Bactrim®	
VI. R. 2/94	- Hospitalisation systématique pour surveillance de la maladie HIV		

<sup>1</sup> traitement pris au moment où nous est parvenu le prélèvement.

Nom Type de prlv. Date du LA et/ou SF	D D G <sup>1</sup>	Séroconversion vers :	Prophylaxie	Devenir de l'enfant
BO. S. SF et LA 13/7/93	24/12/92	20-25 SA <sup>2</sup>	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
DU. M.-P. SF et LA 27/12/94	20/07/93	4 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
FR. E. SF et LA 07/09/93	15/05/93	péri- conceptionnelle	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
GA. B. SF et LA 13/9/93	17/04/93	antéconceptionnelle	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
LE. C. SF et LA 20/3/93	20/03/94	24 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
RE. N. SF et LA 23/11/93	07/07/93	10 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
RE. F. LA 6/6/94	05/03/94	8 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
PA. C. SF et LA 30/5/94	14/01/94	9 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
N. M.-A. SF et LA 18/5/94	20/10/93	24 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
PL. J. LA 24/3/94	08/11/93	Périsconceptionnelle	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
CO. N. SF et LA 26/07/94	24/02/94	14 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	Pas de toxoplasmose congénitale.
BR. M. LA 12/07/94	12/03/94	15 SA	Rovamycine <sup>®</sup>	<b>Toxoplasmose congénitale sérologique.</b>

**femmes ayant fait une  
séroconversion toxoplasmique au  
cours de leur grossesse**

<sup>1</sup> Date de début de grossesse

<sup>2</sup> SA : semaines d'aménorrhée

Nom Date de prélèvement	Age	Renseignements cliniques	traitement après ponction	Évolution
RE. M.-L. 08/11/93	11 ans	uvéïte de l'œil droit	Atropine® collyre; Chibrocadron®	Patient non revu
MA.P 06/12/93	33 ans	1981: chorioretinite toxoplasmique. 1993:Récidive de chorioretinite autour d'un foyer plus ancien.;	Rovamycine®	Patient non revu
PE. A. 30/05/94	13 ans	Baisse brutale de l'acuité visuelle de l'œil droit. FO:chorioretinite. Une éventuelle <b>séroconversion</b> maternelle au cours de la grossesse a été évoquée,mais non confirmée par la suite.	Adiazine® Molocide®; Solupred.pendant un mois puis Rovamycine®	Amélioration sous traitement. Problème de <b>sarcoïdose</b> évoqué mais non certain
LE. J. 18/04/94	34 ans	Chorioretinite sur œil unique.	Etait sous Adiazine® Malocide® Solupred.avant cette ponction d'HA.	La <b>sérologie</b> <b>de Lyme</b> est revenue très <b>positive</b> . Arrêt du trt. ; mis sous Clamoxyl®.
PE. C. 05/04/94	28 ans	Uvéïte antérieure et postérieure sur œil unique.	Atropine® collyre Chibrocadron® ; Solupred.	Origine probablement <b>infectieuse</b> <b>dentaire</b> .

Patients suspects de chorioretinite toxoplasmique chez  
lesquels une ponction d'humeur aqueuse a été effectuée

## 1.2. Les témoins positifs

Ils ont été préparés à partir de la souche RH, souche d'origine humaine, virulente chez la souris, isolée par Sabin en 1941 dans le cadre d'une encéphalite toxoplasmique chez un enfant de 6 ans.

C'est la souche de référence, entretenue par passages successifs tous les 3 jours chez la souris.

### Mode de préparation:

#### Préparation des témoins RH

Ils ont été préparés à partir d'ascite de souris infestées par la souche RH. Le liquide péritonéal a été prélevé de façon non traumatique afin d'éviter autant que faire se peut la présence de sang.

L'ascite recueillie est lavée trois fois en PBS et centrifugée à 1500 tours/min pendant 15 minutes.

Le culot restant est remis en suspension dans environ 10 ml de PBS et compté en cellule de Malassez. On effectue ensuite des dilutions afin d'obtenir des tubes comportant :

1000 toxoplasmes	} dans 150 µl de PBS + 10 000 cellules (fibroblastes humains provenant d'une culture cellulaire stérile)
100 toxoplasmes	
50 toxoplasmes	
10 toxoplasmes	
5 toxoplasmes	
1 toxoplasme	

La concentration en trophozoïtes est contrôlée aussi loin qu'il est possible de le faire en cellule de Malassez. Il est certain que, pour de faibles quantités de toxoplasmes (50, 10, 5, 1), il est impossible d'affirmer le nombre exact de parasites réellement présents dans le volume de 150 µl.

On notera que ces témoins positifs contiennent, en plus des tachyzoïtes de *T. gondii* des cellules fibroblastiques. C'était un choix délibéré de notre part, afin de se placer au plus près des conditions de réalisation de la PCR chez le malade (le parasite n'étant jamais pur au sein d'un prélèvement)

- Une autre série de témoins positifs a été réalisée dans des conditions encore plus proches de la réalité, sur du sang de souris en

pleine phase de parasitémie trois jours après infestation par la souche RH. Les cellules mononucléées et les granulocytes ont été séparés et conservés selon les mêmes conditions que le sang humain ( cf "méthodes").

### Préparation des 7 souches autres que RH

Afin de déterminer la spécificité de notre technique de PCR, il a été nécessaire de préparer d'autres témoins de *T. gondii* appartenant à 8 zymodèmes différents (Cf tableau ci-dessous).

Ces souches ont été préparées de la même manière que la souche RH, mais il n'a pas pu être effectué de décompte exact des trophozoïtes présents. En effet, ces souches sont en général moins virulentes chez la souris, tout en entraînant une importante réaction inflammatoire. Il est alors difficile de compter les parasites au sein des cellules réactionnelles. De plus, du fait de l'importante réaction inflammatoire, il nous a paru inutile de rajouter des cellules fibroblastiques à l'échantillon.

Souches	Origine	pathogénicité pour la souris	Zymodème
RH	encéphalite toxoplasmique humaine	virulente	1
S3	fœtus avorté de mouton	chronique	2
M7741	Infection latente chez un mouton	chronique	3
ELG	Encéphalite aigue chez un HIV positif au stade SIDA	intermédiaire	4
MAS	Toxoplasmose congénitale	virulente	5
RUB	Souche isolée d'un LBA, reponsable d'une toxoplasmose sévère chez un patient immunocompétent contaminé en forêt guyanaise	virulente	6
CASTEL	Souche isolée d'un fœtus avorté de mouton en Uruguay	intermédiaire	7
TONT	Souche isolée d'une toxoplasmose congénitale avec ascite et hydrocéphalie	virulente	8

### **-Préparation de la souche *H. hammondi***

C'est une coccidie voisine de *T. gondii*.

La totalité du surnageant d'une culture cellulaire d'*H. hammondi* a été prélevé et centrifugé 10 mn à 2000 tours / mn. Le culot a été récupéré puis lavé et centrifugé deux fois en PBS stérile. Cette opération terminée, le culot restant a été remis en suspension dans 150 µl avant d'être congelé à -20°C.

### **1.3. Les témoins négatifs**

Ils ont été préparés à partir d'eau stérile. Celle-ci a été traitée avec le tampon de lyse suivant le protocole d'extraction d'ADN puis a subi les autres étapes de la PCR (cf: "méthodes"). Ceci a pour avantage de tester à la fois le tampon de lyse et tous les autres réactifs, et de révéler immédiatement un réactif éventuellement contaminé par de l'ADN toxoplasmique.

## **2. MÉTHODE**

### **2.1. Traitement et conservation des prélèvements**

#### **2.1.1. Prélèvement de sang : séparation des granulocytes**

Nous avons préféré l'utilisation d'Histopaque® (les autres possibilités étant le Ficoll ou le Dextran).

Ce produit permet une assez bonne visualisation de 3 couches :

- Le plasma
- Un anneau de cellules mono et polynucléées
- L'Histopaque® et les cellules de la lignée rouge.

Pour 6 ml de sang, on procède de la manière qui suit:

- Introduire 6 ml d'Histopaque®1119 (Sigma,ref 1119-1) dans un tube cône.
- Par dessus, déposer avec précaution 6 ml de sang total.
- Centrifuger à 1950 tours/min (700g) pendant 30 minutes à température ambiante.

- Aspirer et rejeter la couche de plasma jusqu'à quelques mm de l'anneau .
- Récupérer les cellules de la lignée blanche dans un autre tube.
- Laver les cellules par centrifugation 10 min à 1000 tours/min (200g) dans 10 ml de tampon phosphate (PBS) pH 7,2 stérile.
- Après avoir éliminé le surnageant et remis le culot en suspension douce dans le PBS, répéter l'opération précédente de lavage 2 à 3 fois.
- Remise en suspension du culot dans 150 µl de PBS, congélation à -20°C jusqu'à l'étape suivante, qui est l'extraction de l'ADN.

### **2.1.2. Humeur aqueuse**

Le volume disponible est d'environ 200 µl.

Dans un premier temps, le prélèvement est centrifugé à 10 000 tours/min pendant 10 minutes.

Dans un 2<sup>ème</sup> temps, on récupère le surnageant pour les sérologies sur l'humeur aqueuse et le culot restant est stocké à -20°C.

### **2.1.3. Liquide amniotique**

Une partie du prélèvement de LA est inoculé à la souris, une autre est gardée pour la culture cellulaire, et enfin, le restant servira à la PCR. Cet échantillon (en général 10 ml de liquide), est alors centrifugé à 2000 tours/min pendant 10 minutes, puis on prélève le surnageant avant de remettre le culot en suspension dans 10 ml de PBS stérile. Sur le surnageant sera pratiqué une recherche d'IgM anti toxoplasmiques.

Le culot, quant à lui, sera lavé deux à trois fois dans les mêmes conditions, afin de le débarrasser du maximum de débris avant la congélation à -20°C dans 150 µl de PBS.

## **2.2. Extraction de l'ADN d'après la technique décrite par LOPAREV et coll. [50]**

Cette technique est basée sur l'utilisation de détergents non ioniques et de solvants organiques pour lyser la membrane cellulaire et détruire

les protéines. Elle pourrait même être utilisée sur de petites quantités de sang total, mais il vaut mieux rester prudent vis à vis des inhibiteurs et nous avons préféré travailler sur des produits déjà débarassés de leurs globules rouges avant d'appliquer cette technique d'extraction. Cette méthode, d'après son auteur, donnerait approximativement 40 à 50 µg d'ADN/ml de sang traité.

#### **Voici donc comment procéder :**

Le culot cellulaire précédemment congelé est repris volume à volume dans le tampon de lyse (contenant NaOH 10mM, Twen 20 0,5%, Nonidet P40 0,5%), puis toujours volume à volume, on rajoute du NaI (iode de sodium) 6 M (300 µl) et enfin 600 µl de chloroforme-isoamylalcool (24 volumes de chloroforme pour 1 d'isoamylalcool).

Après un temps de centrifugation de 10 minutes à 10 000 tours/min à température ambiante, l'ADN est précipité grâce à l'isopropanol (1ml) et grâce à une centrifugation au froid de 30 minutes à 10 000 tours/min. À ce stade, le culot de l'ADN est visible sous forme d'un petit flocon blanc collé contre la paroi. Après avoir rejeté la partie liquide, il ne reste plus qu'à le laver à l'aide de 500 µl d'éthanol à 70%, et d'une centrifugation de 10 minutes à 10 000 tours/min. Pour terminer, on rejette l'éthanol et on remet en suspension le culot d'ADN dans 50 à 100 µl d'eau distillée stérile.

Afin d'obtenir une bonne dissolution de l'ADN, il est conseillé de laisser le microtube en rotation lente à +4°C pendant un minimum de 24 heures, l'idéal étant de pouvoir attendre 1 semaine.

#### **Dans le cas d'une humeur aqueuse**

La préparation a été un peu différente. En effet, devant la faible quantité de prélèvement, on a dû se contenter de mélanger le culot avec 75 µl d'eau distillée stérile et de le faire bouillir pendant 10 minutes à 95°C.

### **2.3. Vérification de la quantité d'ADN extrait**

Elle se fait par photométrie, les bases absorbant fortement dans l'ultra-violet à 260 nm.

Sachant qu'une unité de densité optique (DO) à 260 nm est équivalente à 50µg/ml d'ADN, on peut calculer la quantité d'ADN de l'échantillon. Par ailleurs, afin de vérifier la pureté de l'ADN extrait, il sera bon de doser en parallèle la quantité de protéines. Celles-ci ont la

propriété d'absorber à 260 nm et également à 280 nm. Il sera alors facile, ayant la valeur de la DO à 260 et celle à 280 nm de faire le rapport de ces 2 valeurs.

On considère qu'un ADN pur doit avoir un rapport de DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> compris entre 1,8 et 2. En pratique, un rapport aux alentours de 1,5 est considéré comme acceptable.

## 2.4. Préparation de la PCR

(Technique aimablement communiquée par les Drs Robert, Paugam et Dupouy-Camet du service de parasitologie de l'hôpital Cochin à Paris). Cette technique repose sur la réalisation de 2 PCR successives, l'une amplifiant le gène B1, l'autre le gène TGR1E

### 2.4.1. Réactifs

- Tampons d'amplification 10 X : MgCl<sub>2</sub> 25 mM, Tris HCl 0,1M à pH 8,3, KCl 0,5M, gélatine 0,1%.

- Bases (dNTP) : dATP, dCTP, dGTP, dUTP à la concentration de 200 mM pour les trois premières et de 400 mM pour le quatrième (ceci afin de compenser une éventuelle destruction par l'UNG).

- Deux couples d'oligonucléotides amorces (pour effectuer les 2 PCR simultanées sur chaque prélèvement), synthétisés par Bioprobe

- Pour la reconnaissance du gène B1, 2 oligonucléotides :

B5 : 5'TGAAGAGAGGAAACAGGTGGTTCG (23 Mer)

B6 : 5'CCGCCTCCTTCGTCCGTCGTA (21 Mer)

qui donneront un segment amplifié de 130 paires de base

- Pour la reconnaissance du gène TGR1E 2 oligonucléotides :

T1 : 5'ATGGTCCGGCCGGTGTATGATATGCGAT (28 Mer)

T2 : 5'TCCCTACGTGGTGCCGCAGTTGCCT (25 Mer)

qui donneront un segment amplifié de 191 paires de base

- Taq polymérase à 5U/μl (Perkin Elmer).

- UNG à 1U/μl (Boehringer).

## 2.4.2. Amplification

On prépare une solution mixte contenant 5 µl de tampon 10X, 5µl de l'ensemble des dNTP, 2µl de l'oligonucléotide 1, 2µl de l'oligonucléotide 2, 0,25µl de Taq polymérase, 0,5µl d'UNG, et de l'eau stérile QSP 50µl (en tenant compte du volume apporté par la solution d'ADN)..

Enfin, 1 µg d'ADN de l'échantillon à analyser est mélangé à la préparation et deux gouttes d'huile de paraffine stérile seront déposées à l'intérieur de chaque microtube, ceci afin d'éviter l'évaporation de la solution au cours des cycles d'amplification..

Pour terminer cette 2<sup>ème</sup> étape, chaque tube sera enfermé dans le thermocycleur (Perkin Elmer Cetus) pour 39 cycles qui se décomposent de la manière qui suit :

- cycle n° 1 --> 5 min d'incubation à 50°C: action de l'UNG sur d'éventuels amplicons contaminants
  
- cycle n° 2 --> • 5 min à 94°C : dénaturation de l'ADN total, transformé en ADN simple brin, et inactivation de l'UNG.
  - 40 s à 65°C : hybridation des oligonucléotides avec leurs éventuels brins d'ADN complémentaires.
  - 40 s à 72°C : élongation par la Taq polymérase.
  
- 35 cycles n° 3 --> 

• 30 s à 94°C	}	Répétition des cycles de dénaturation/ hybridation/ élongation
• 40 s à 65°C		
• 40 s à 72°C		
  
- 1 cycle n° 4 -->
  - 30 s à 94°C
  - 40 s à 65 °C
  - 15 min à 72°C : élongation finale

À la fin de ce dernier cycle, il est impératif d'arrêter, par 50 $\mu$ l de chloroforme, les réactions qui pourraient se produire. Ceci afin d'éviter l'action éventuelle de l'UNG résiduelle sur les amplicons néoformés [41].

Le produit peut ensuite être conservé à 4°C pendant 24 à 48 heures.

### **2.4.3. Révélation après électrophorèse en gel d'agarose à 3%**

#### **2.4.3.1. Les produits utilisés**

- Agarose pour biologie moléculaire (Sigma).

On dissout par la chaleur et sous vide 2 g d'agarose dans 65 ml de tampon.

- TAE 1X (tampon de migration) :

Trisbase	40 mmol
EDTA	1 mmol à pH 8
Acide acétique glacial	1,14 ml
ou acétate	20 mmol

- BET (bromure d'éthidium) :

4,8  $\mu$ l de la solution sera mélangé au gel d'agarose encore liquide.

- Solution de bleu de bromophénol à 0,25% et de sucrose à 40%.

- Marqueur de poids moléculaire n°IV (BOEHRINGER).

#### **2.4.3.2. La migration**

On dépose 20  $\mu$ l de produit d'amplification mélangé à une goutte de la solution au bleu de bromophénol dans chaque puits du gel d'agarose.

Le premier puits est réservé au témoin négatif.

Le deuxième puits accueille le marqueur de poids moléculaire.

Le troisième puits reçoit le témoin positif.

Les puits suivants reçoivent les produits à analyser.

La migration s'effectue sous 120 Volts pendant environ 30 minutes. On l'arrêtera lorsque les plus faibles marqueurs de poids moléculaires

auront atteint les 3/4 du gel. Au delà, la visibilité des produits d'amplification est de moins en moins bonne.

#### 2.4.3.3. La lecture

Elle s'effectue sous une lampe à UV et une photographie est prise afin de garder une trace visuelle de la manipulation.

### 2.5. Quelques remarques concernant les précautions prises pour éviter les contaminations.

Un des principaux risques de la PCR est, on l'a vu, celui d'obtenir des faux positifs suite à l'utilisation de réactifs souillés. Ce risque était non négligeable pour nous, car nous entretenons la souche RH au laboratoire. Il a donc fallu prendre d'emblée des mesures draconiennes.

Nous avons décidé d'effectuer la plus grande partie des manipulations à la faculté, créant ainsi une "barrière" d'éloignement avec le laboratoire. Les seules opérations effectuées à l'hôpital sont :

- La récupération du culot à partir du prélèvement (manipulations sous la hotte).
- La migration des produits d'amplification.
- La lecture.

A la faculté, où l'on accède après avoir changé de blouse, nous avons préparé 3 pièces distinctes, assez éloignées les unes des autres:

- La pièce d'extraction de l'ADN où, comme son nom l'indique, on prépare l'ADN. C'est également dans cette pièce que l'on ajoutera 1 µg d'ADN à chaque tube contenant tous les réactifs pour la PCR.
- La pièce de préparation des tampons, qui est aussi la salle où se déroule la 1<sup>ère</sup> partie de la PCR proprement dite, c'est à dire la préparation du mélange tampon / dNTP / amorces / Taq polymérase / UNG.  
On accède à cette pièce par un "sas" où l'on change une nouvelle fois de blouse et où l'on met des sur-chaussures et des gants.
- La pièce d'amplification: elle contient le thermocycleur Perkin Elmer Cetus.

On notera par ailleurs que:

- 1) - chaque pièce contient son propre matériel (pointes à filtres, pipettes, réactifs...) qui y reste obligatoirement.
- 2) - on manipule avec des gants, ceux-ci étant changés entre chaque prélèvement.
- 3) - on autoclave tous les tampons qui peuvent le supporter.
- 4) - on aliquote tous les tampons ou produits qui peuvent l'être.
- 5) - lorsqu'un tube est ouvert, on attend de l'avoir refermé avant d'ouvrir le deuxième, ceci afin d'éviter des projectons d'aérosol.

## RÉSULTATS

### 1. MISE AU POINT DE LA PCR

#### 1.1. Évaluation de la sensibilité de la PCR

Après quelques mises au point, nous avons réussi à obtenir des signaux à partir des témoins positifs d'ascite de souris inoculées avec la souche RH, mélangée aux fibroblastes humains (Cf Matériel et méthodes). Ces témoins étant au départ très riches, nous sommes descendu graduellement en concentration :

	de 1000 toxoplasmes et 10000 cellules		
à :	100	"	"
	50	"	"
	20	"	"
	10	"	"
	5	"	"
	1	"	"

Chaque prélèvement a été amplifié en parallèle avec le gène B1 et le gène TGR1E et révélé sur gel d'agarose avec le bromure d'éthidium.

Nous sommes arrivés à obtenir des signaux, faibles mais visibles à un toxoplasme par microtube. Ce signal est apparu la première fois avec le gène B1. En reprenant un autre échantillon contenant un toxoplasme pour une nouvelle PCR, nous avons obtenu aussi le signal en TGR1E. Ce premier résultat positif avec un seul gène était probablement dû au fait que le parasite étant en très faible quantité, celui-ci était totalement passé dans le microtube contenant les amorces B1.

Nous avons aussi obtenu un signal nettement visible à partir des leucocytes provenant du sang de souris inoculées depuis 3 jours avec la souche RH (voir photo n° 3 page 91).

## 1.2. Évaluation de la spécificité de la PCR vis à vis des différentes souches de *Toxoplasma gondii*

Nous avons testé 8 souches de *T. gondii* appartenant à 8 zymodèmes différents afin de démontrer la persistance des gènes B1 et TGR1E à travers l'espèce. Ces tests ont été concluants (voir photos n° 1 et 2 pages 89 et 90) et parfaitement reproductibles. Malheureusement, au retraitage de la photo n° 1, le signal de la souche TONT étant faible sur l'original, celui-ci n'apparaît plus.

Pour essayer de déterminer les limites de cette spécificité, nous avons testé une coccidie très voisine du toxoplasme: *Hammondia hammondi*. La PCR a permis de faire apparaître la communauté du gène B1 entre les deux espèces mais pas celle du gène TGR1E.

Les autres espèces présentes chez l'Immunodéprimé (*Cryptococcus*, *Candida*, ...) ou d'autres coccidies voisines de *T.gondii* (*Sarcocystis*) ayant déjà été analysées par d'autres auteurs [1, 38], et, n'ayant pas montré de réactions croisées avec les gènes B1 et TGR1E, n'ont pas été ré-étudiés au cours de ce travail.

## 1.3. Comparaison de deux techniques d'extraction de l'ADN

- La technique d'extraction "classique" décrite par Manniatis dans son livre [53].

Cette méthode, longue et contraignante (il faut débiter l'extraction le soir, laisser incuber toute une nuit et poursuivre les manipulations durant toute une matinée) reste celle de référence et assure un ADN hautement purifié.

- La technique de Loparev [50], qui est plus rapide car elle peut se réaliser en 3 heures.

Les deux méthodes ont été étudiées sur des échantillons de 100, 50 et 5 toxoplasmes. Les résultats dans ces deux méthodes, n'ont pas montré de différence significatives visibles, après révélation par le bromure d'éthidium, quant à l'intensité des signaux relevés . . .

## 1.4. Évaluation de l'effet de l'UNG sur la PCR

Différents échantillons de témoins positifs à des concentrations décroissantes de parasites ont été testés avec UNG, puis sans UNG au cours d'une même manipulation.

En s'entourant d'un certain nombre de précautions (doubler la quantité de dUTP dans le milieu réactionnel lorsqu'on utilise l'UNG, et surveiller la fin de la réaction de PCR pour ajouter le chloroforme), il n'a pas été observé de résultat différent à l'œil nu entre les PCR avec UNG et celles sans UNG ( ce résultat vient confirmer les conclusions de Longo et all [49] ).

## 2. RÉSULTATS DES PCR EFFECTUÉES SUR LES DIVERS PRÉLÈVEMENTS PATHOLOGIQUES

Nom et date du prélèvement	Inoculation LA à la souris	Culture cellulaire du LA	Inoculation de SF à la souris	Recherche D'IgM sur SF	Marqueurs non spécifiques	PCR sur LA	
						B1	TGR1E
BO. S. 13/7/93	-	-	-	-	-	-	-
DU. M.-P. 27/12/94	-	-	-	-	-	-	-
FR. E. 7/09/93	-	-	-	-	-	-	-
GA. B. 13/9/93	-	-	-	-	-	-	-
LE. C. 20/3/93	-	-	-	-	-	-	-
RE. N. 23/11/93	-	-	-	-	-	-	-
RE. F. 6/6/94	-	-	NF	NF	NF	-	-
PA. C. 30/5/94	-	-	-	-	-	-	-
N. M.-A. 18/5/94	-	-	-	-	-	-	-
PL. J. 24/3/94	-	-	NF	NF	NF	-	-
CO. N. 26/07/94	-	-	-	-	-	-	-
BR. M. 12/07/94	-	-	NF	NF	NF	-	-

Résultats obtenus sur SF et LA

Nom	Recherche d'une synthèse locale d'anticorps antitoxoplasmiques	Sérologie de la toxoplasmose	PCR	
			B1	TGR1E
RE. M.-L.	Absence d'Ac dans l'HA	Immunité ancienne	-	-
MA.P	Absence d'Ac dans l'HA	Immunité ancienne	-	-
PE. A.	Absence d'Ac dans l'HA	Immunité ancienne	-	-
LE. J.	Absence d'Ac dans l'HA	Immunité ancienne	-	-
PE. C.	Absence d'Ac dans l'HA	Immunité ancienne	-	-

Résultats obtenus sur les HA

**Résultats obtenus sur les prélèvements de  
sang chez les patients immunodéprimés**

Nom et date du prélèvement	Taux de CD4/mm <sup>3</sup>	Résultat de l'inoculation à la souris	Résultat de la PCR	
			B1	TGR1E
BE. P. 6/9/93 22/11/93	91	NF	-	-
	243	-	-	-
CO. J.-L. 22/11/93	4	-	-	-
CU. M. 22/11/93	243	NF	-	-
DE. G. 22/11/93	13	-	-	-
DR. D. 17/01/1994	574	NF	-	-
FO. M. 1/09/93	90	-	-	-
FR. F. 9/12/93 13/01/93	17	NF	-	-
	ND	NF	-	-
GA. H. 1/10/93 14/12/93	27	NF	-	-
	22	NF	-	-
GI. Lu. 15/12/93	4	NF	-	-
IL. M. 7/12/93	12	NF	-	-
MA. A. 2/02/94	340	NF	-	-
SA. C. 22/11/93	300	-	-	-
VO. L. 1/94	146	NF	-	-
WI. P. 9/12/93	49	NF	-	-
HE M 9/12/93	ND	NF	-	-

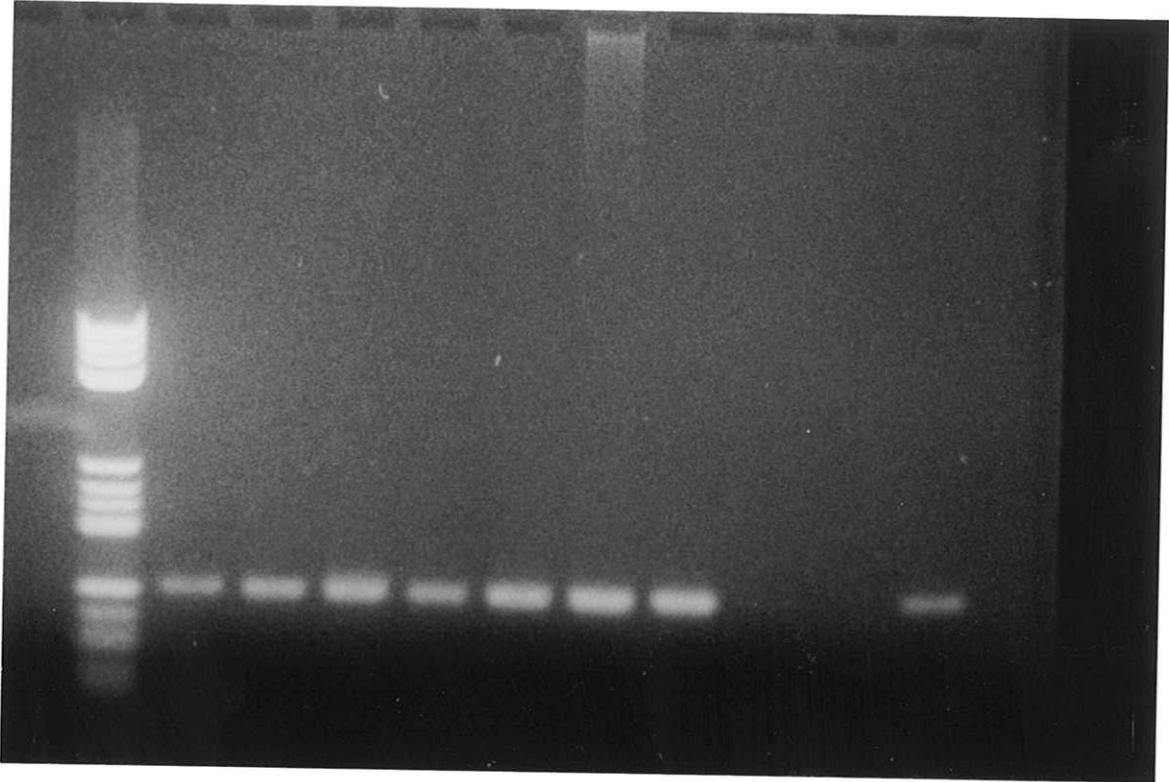
**Résultat obtenu chez la patiente non  
immunodéprimée**

LI. M. 9/94	ND	NF	-	-
----------------	----	----	---	---

Nom et date du prélèvement	Taux de CD4/mm <sup>3</sup>	Résultat de l'inoculation à la souris	Résultat de la PCR	
			B1	TGR1E
AG. P. 15/12/93	35	NF	-	-
BR. A. 7/12/93	308	NF	-	-
CL. V. 26/01/93	30	NF	-	-
DE. J.-P. 7/12/93	328	NF	-	-
GI. La. 1/12/93	673	NF	-	-
GU. B. 22/12/93	281	NF	-	-
HU. C. 7/12/93	375	NF	-	-
NZ. MA. D. 7/12/92	500	-	-	-
PE. P. 14/12/94	159	NF	-	-
PI. B. 22/12/93	11	NF	-	-
PI. J. 7/12/93	898	NF	-	-
SA. F. 22/11/93	ND	NF	-	-
VI. R. 2/94	220	NF	-	-

**Résultats obtenus sur les prélèvements  
de sang chez les patients immunodéprimés  
(groupe témoin)**

Photo n° 1 : amplification à l'aide des amorces B5 et B6 des 8 souches de *T. gondii* appartenant à 8 zymodèmes différents (reconnaissance du gène B1)



**Légende :** bande n° 1<sup>1</sup> : témoin négatif

bande n° 2 : marqueur de poids moléculaire

bande n° 3 : la souche RH: amplification positive à 130

pb

“ “ n° 4 : la souche S3: “ “

“ “ n° 5 : “ “ M7741: “ “

“ “ n° 6 : “ “ ELG: “ “

“ “ n° 7 : “ “ MAS: “ “

“ “ n° 8 : “ “ RUB: “ “

“ “ n° 9 : “ “ CASTEL:“ “

“ “ n° 10 : “ “ TONT : présence d'une

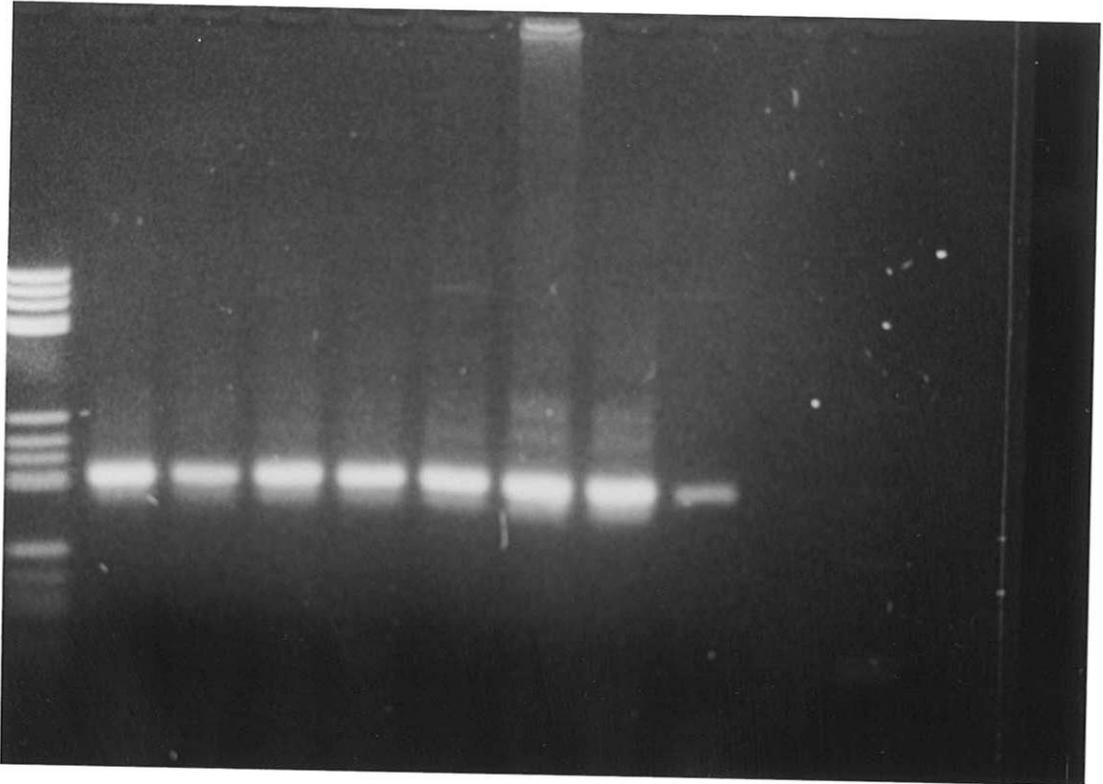
amplification faible qui n'a pu être reproduite lors des retirages de l'original de la photo.

bande n° 11: rien

bande n° 12: *H. hammondi* : présence du gène B1

<sup>1</sup> La lecture se fait à partir de la première bande à gauche

Photo n° 2 : amplification à l'aide des amorces T1 et T2 des 8 souches de *T. gondii* appartenant à 8 zymodèmes différents (reconnaissance du gène TGR1E)



Légende : bande n° 1 : témoin négatif  
bande n° 2 : marqueur de poids moléculaire  
bande n° 3 : la souche RH: amplification positive à 191

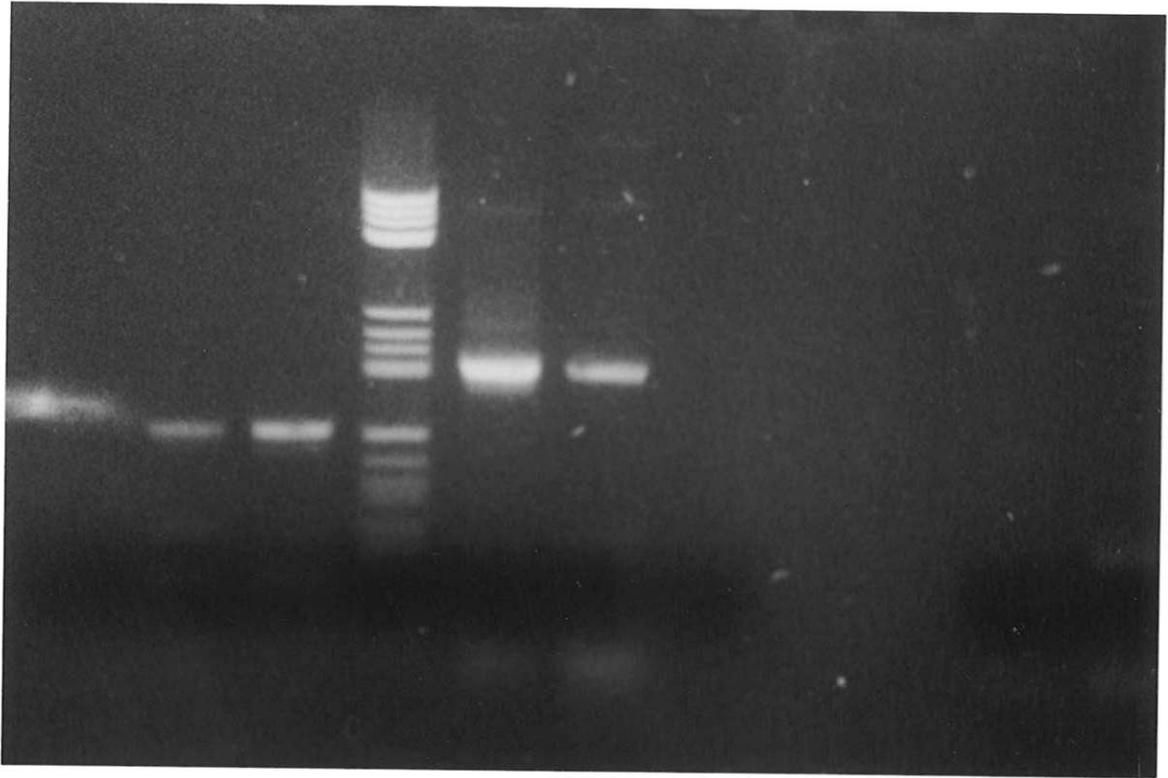
pb

“ “ n° 4 : la souche S3: “ “  
“ “ n° 5 : “ “ M7741: “ “  
“ “ n° 6 : “ “ ELG: “ “  
“ “ n° 7 : “ “ MAS: “ “  
“ “ n° 8 : “ “ RUB: “ “  
“ “ n° 9 : “ “ CASTEL: “ “  
“ “ n° 10 : “ “ TONT: “ “

bande n° 11: rien

bande n° 12: *H. hammondi* : absence du gène TGR1E

Photo n° 3 : amplification à l'aide des amorces B5, B6 et T1, T2 de l'ADN extrait à partir des leucocytes d'une souris infestée avec la souche RH.



**Légende :** bande n° 1 : rien  
bande n° 2 : témoin négatif  
bande n° 3 : ADN amplifié, provenant de la souris  
(gène B1)  
“ “ n° 4 : témoin positif RH (gène B1)  
“ “ n° 5 : marqueur de poids moléculaire  
“ “ n° 6 : témoin positif RH (gène TGR1E)  
“ “ n° 7 : ADN amplifié, provenant de la souris  
(gène TGR1E)  
“ “ n° 8 et suivants : rien

## DISCUSSION

### 1. DISCUSSION SUR LA MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE PCR

Cette mise au point s'est révélée plus longue que prévu. En effet, si la technique de PCR elle-même ne demande que 24 heures, ce temps ne tient pas compte des approvisionnements en réactifs et en matériel, de la préparation des multiples tampons et aliquotage de réactifs. Ces préparations reviennent assez souvent car il vaut mieux conserver à -20°C des produits très concentrés (ils se dégradent moins) pour les diluer 1 à 2 mois avant l'utilisation.

#### 1.1. Interprétation de la sensibilité de la PCR

Après ce temps de mise en route de la technique, nous sommes passé à celui de l'évaluation de la sensibilité de la PCR.

Nous avons vu que l'on a réussi à obtenir un signal pour 1 toxoplasme/microtube. Ce résultat n'a d'abord été visible qu'avec le gène B1, probablement parce que le parasite étant en très faible quantité, il était totalement passé dans le microtube contenant les amorces B1.

On peut aussi supposer que l'amplification était trop faible avec TGR1E pour être visible avec la seule révélation par le bromure d'éthidium. Pour être certain de l'absence ou de la présence d'une amplification, il aurait fallu rajouter à la technique le Southern blot suivi d'une hybridation. Malheureusement pour des raisons de temps et de sonde moléculaire qui a été synthétisée avec 4 semaines de retard, cette deuxième partie de la technique n'a pu être mise au point.

Ce résultat peut être considéré comme très satisfaisant pour une technique de PCR simple. En effet, le signal a été visualisé et s'est révélé reproductible. Ce résultat est d'ailleurs en accord avec la sensibilité de la technique vue par d'autres auteurs [38].

#### 1.2. Interprétation de la spécificité de la PCR

Nous avons vu que la présence des 2 gènes était retrouvée chez les 8 souches de *T. gondii* étudiées.

Par contre, un problème de fausse reconnaissance été noté vis à vis d'*Hammondia hammondi* avec le gène B1. Ce problème ne devrait pas, en pratique, altérer l'interprétation d'un résultat puisque *Hammondia*

*hammondi* n'est pas connu en pathologie humaine. Ce parasite, en effet, n'a jusqu'à présent été décrit que chez certaines espèces animales (le chat, hôte définitif, et les hôtes intermédiaires : rats, souris, lapins, chiens, chèvres) [23]. A ce jour, aucune infection humaine avec ce parasite n'a été retrouvée. Mais les infections à *H. hammondi* étant responsables chez l'animal de sérologies positives vis à vis de *T. gondii*, l'éventualité que certaines sérologies toxoplasmiques humaines positives puissent être dues à des infections par *H. hammondi* n'est pas à exclure.

### **1.3. Interprétation de la comparaison des 2 techniques d'extraction de l'ADN**

Ces 2 méthodes ont, comme on l'a vu, donné des signaux identiques vis à vis des échantillons étudiés. On a donc considéré que l'extraction "rapide" donnant des résultats satisfaisants, celle-ci serait plus appropriée à une technique destinée à être employée en routine au laboratoire.

### **1.4. Interprétation de l'effet de l'UNG sur la PCR**

Vu les bons résultats de la PCR avec l'UNG, nous avons travaillé en permanence avec elle, considérant que l'augmentation du coût de la réaction était justifiée par la sécurité que l'emploi de cette enzyme apportait.

## **2. DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS SUR NOS PRÉLÈVEMENTS**

Les résultats obtenus sur les différentes séries de patients sont résumés dans les tableaux pages 85 à 88. Ainsi qu'on peut le voir, ils sont tous négatifs. Pourquoi? C'est à cette question que nous allons essayer de répondre.

### **2.1. Liquides amniotiques**

Les résultats PCR sont concordants avec ceux des autres examens biologiques effectués sur le LA et le SF quand celui-ci a été prélevé.

Par contre, tout ce bilan a été pris, une fois, en défaut. En effet l'enfant de BR M. s'est révélé, à la naissance, porteur d'une toxoplasmose congénitale. Au cours du bilan prénatal, seule la ponction de LA a été réalisée, et les différents examens pratiqués dessus étaient revenus négatifs. Malheureusement, à l'accouchement, l'examen du sang du cordon a révélé des IgM et des IgA positives, et l'inoculation à

la souris du placenta est revenue elle aussi positive. Par contre, on ne notait pas de signe clinique de toxoplasmose, et le rapport des CI LCR/sérum chez le nouveau né était inférieur à 3.

On peut tenter de donner plusieurs explications à ce faux négatif:

1<sup>ère</sup> possibilité:

Au moment de la ponction de LA, l'enfant pouvait ne pas être infecté. En effet, Thulliez et Desmots [71], précisent qu'il y a toujours un délais, parfois long, entre la contamination de la mère et celle de son fœtus. En particulier, on peut parfois mettre en évidence une infection du placenta alors que l'enfant n'est pas encore touché. Dans le cas présent, le liquide amniotique a été prélevé environ 4 semaines après l'infection maternelle, ce qui est généralement considéré comme un délais suffisant pour permettre l'infection fœtale.

2<sup>ème</sup> possibilité: la présence d'inhibiteurs

Ce LA lorsque nous l'avons reçu était très hémorragique. Tous les lavages effectués ne peuvent totalement éliminer l'hème et celui-ci est un puissant inhibiteur de la Taq polymérase.

Malheureusement, ne disposant pas de contrôle interne, la présence ou l'absence d'inhibiteurs est difficile à prouver.

L'héparine ne peut pas être incriminée puisque, après vérification, il apparaît que seringues et aiguilles ne sont pas héparinées pour les ponctions de LA.

3<sup>ème</sup> possibilité:

Afin d'être certain de l'absence de signal, il aurait fallu disposer de l'hybridation. Celle-ci permet d'augmenter la sensibilité de la technique. Un signal invisible après simple révélation par le bromure d'éthidium ne se détecte parfois qu'après marquage par une sonde.

## 2.2. Humeurs aqueuses

Là aussi tous les prélèvements analysés sont revenu négatifs: absence de synthèse locale d'immunoglobuline et PCR négative.

D'après les renseignements cliniques, on peut à priori, éliminer deux cas dont le suivi a réfuté l'étiologie toxoplasmique de la chorioretinite. Il s'agit d'un patient qui présentait une maladie de Lyme à symptomatologie oculaire (LE J.) et d'un autre qui avait une infection dentaire (PE C.).

Pour les trois autres malades, on ne peut exclure l'étiologie toxoplasmique: en effet pour RE ML. et MA P. nous n'avons pas obtenu de renseignements suffisants concernant l'évolution de leur chorioretinite, car ils ne sont pas revenus en consultation. PE A., lui, a été amélioré par un traitement spécifique. Mais il s'est révélé indemne de toxoplasmose congénitale.

S'il existe un ou des faux négatifs dans cette série il peut y avoir plusieurs explications:

- La faible quantité de prélèvement reçu, dont l'ADN extrait n'a pu être dosé, ne contenait peut-être pas le parasite.
- Le fait que nous ayons divisé cet ADN en deux afin de le tester avec les amorces des gènes B1 et TGR1E. À l'avenir, il vaudrait peut être mieux tout tester avec le gène B1, en sachant que, en cas de positivité, l'examen ne sera pas recontrôlable.
- par ailleurs, Aouizerate et Cazenave [4, 5, 13], au cours de leurs travaux n'ont retrouvé qu'environ 35% d'HA positives en PCR en analysant des prélèvements provenant de sujets hautement suspects de chorioretinite toxoplasmique. Face à ce faible résultat, on peut proposer deux réponses:
  - toujours la faible quantité de prélèvements.
  - mais aussi le fait que le parasite est plus fréquemment localisé au niveau de la chambre postérieure de l'œil, et qu'il ne circule pas en permanence au niveau de la chambre antérieure.

## **2.3. Sangs de sujets immunodéprimés**

### **2.3.1. Groupe de patients suspects d'une toxoplasmose évolutive**

Les 3 prélèvements de sang provenant des patients présentant une TC qui ont pu être étudiés en parallèle avec inoculation à la souris et PCR se sont révélés négatifs.

Il y a donc eu, là aussi, corrélation entre les examens biologiques classiques et la PCR.

- Pour les 5 cas de TC ( dont le diagnostic a été établi sur des arguments cliniques et radiologiques) :

- 4 patients étaient sous traitement spécifique depuis plus de 4 semaines et leurs scanners de contrôle ne montraient plus que des images séquellaires. Les chances de détecter une parasitémie devenaient alors très faibles.

- Le 5<sup>ème</sup> patient (BE P.) a fait une rechute de TC 3 jours avant le prélèvement de sang qui nous est parvenu. D'après les renseignements que nous avons pu obtenir, ce malade prenait son traitement de façon très irrégulière; il n'est donc pas surprenant qu'il ait rechuté.

La PCR réalisée a été effectuée sur un échantillon de sang alors qu'il était traité à dose efficace depuis deux jours. Ceci peut suffire à avoir éliminé le parasite dans le sang circulant. En effet, les travaux de Dupouy-Camet et coll. [29] sur des sangs de patients HIV suspects de TC ont bien montré que, si l'on peut retrouver une PCR positive, après plus de 12 jours de traitement, celle-ci peut se négativer en 2 jours. En fait, si la parasitémie en cas de toxoplasmose "localisée" est parfois présente, faisant de la toxoplasmose une maladie généralisée, elle semble cependant relativement faible n'étant pas retrouvée à chaque fois dans le prélèvement (LCR, sang, LBA) (cf. les résultats des travaux présentés dans le chapitre PCR).

- Dans un cas où la sérologie montrait une augmentation très importante des titres pour la toxoplasmose (DR D.), la PCR et la clinique n'ont apporté aucun argument en faveur d'une localisation toxoplasmique. Nous avons d'ailleurs vu que la valeur de la sérologie en matière de réactivation toxoplasmique était très aléatoire. De plus, il peut y avoir un long décalage entre l'apparition d'une symptomatologie et l'augmentation du taux des Ac.

- Les 7 autres patients HIV dont nous avons reçu le sang dans le cadre d'une suspicion de toxoplasmose se sont révélés négatifs en PCR. En consultant à posteriori leur dossier nous nous sommes aperçu que l'étiologie de toxoplasmose avait été abandonnée au profit d'une autre pathologie.

- En ce qui concerne le cas d'hémopathie maligne, l'enfant était sous traitement spécifique au moment du prélèvement et n'avait jamais présenté de manifestations cliniques de sa toxoplasmose.

- Dans le cas d'une patiente non ID présentant une toxoplasmose persistante (LI ML), il aurait été intéressant d'obtenir les prélèvements avant le début de son traitement, ou tout au moins peu de temps après. Celui qui nous a été envoyé a été prélevé durant le début de sa 2<sup>ème</sup> cure. Elle ne présentait d'ailleurs plus, à ce stade, de manifestations cliniques en rapport avec le parasite.

### 2.3.2. Groupe de témoins négatifs

Il n'y a eu aucun problème de contamination; ils sont bien apparus négatifs en PCR.

### 2.4. Remarque

Pour être complet, on signalera un problème lors du premier lot d'ADN que l'on a amplifié : GA H. était apparu positif en B1, de même que, plus faiblement, IL M. Les deux échantillons ayant été côte à côte au cours de toutes les manipulations, et sortant positifs uniquement en B1, ceci nous est apparu comme hautement suspect et nous avons pensé que, par inexpérience, il devait y avoir eu une erreur de manipulation. En effet, ces 2 échantillons, retestés par la suite, d'abord à partir du 1<sup>er</sup> aliquote d'ADN, puis à partir d'un 2<sup>ème</sup> datant du même jour, sont revenus négatifs sans aucun doute. Cette erreur ne s'est plus jamais reproduite et elle nous a permis, pour la suite, de tirer des conclusions :

- La reproductibilité d'une PCR est un argument indispensable pour l'interprétation.
- Les 2 gènes amplifiés doivent être positifs
- La manipulation doit être extrêmement soignée.

## CONCLUSION

La PCR, technique passionnante de biologie moléculaire, a suscité beaucoup d'espoir pour la mise en évidence d'un certain nombre d'agents pathogènes, dont le toxoplasme. En effet, pour la visualisation directe et indirecte de ce parasite, les moyens à notre disposition restent insuffisants :

l'inoculation à la souris nécessite 3 semaines.

la culture cellulaire donne des résultats inconstants

les techniques de coloration et d'immunomarquages ne se font pas sur n'importe quel type de prélèvement et ne sont positifs que lorsque les échantillons sont très riches en parasites.

la sérologie est d'interprétation aléatoire chez l'immunodéprimé, et les IgM ou les IgA spécifiques peuvent manquer sur le sang fœtal ou à la naissance.

La PCR, avec sa sensibilité et le développement qu'elle connaît à l'heure actuelle, est apparue comme salvatrice.

Il ne faut cependant pas oublier que c'est une technique délicate, qui demande une assez longue pratique et dans la manipulation, et dans l'interprétation des résultats.

A ce sujet, l'article publié par FOU DRINIER et coll. est révélateur [35]. Cette équipe, au CHU de Reims, a passé deux ans en mises au point diverses avec une à deux personnes à temps plein avant de considérer avoir obtenu une assez bonne expérience de la PCR.

Cet aveu inspire l'humilité face à nos travaux, qui ont été forcément réduits:

sur le plan du temps (environ 8 mois de manipulations effectives)

sur le plan des prélèvements testés (49), ce qui est un nombre encore trop limité pour donner un recul suffisant.

sur la technique, qui n'a pas été menée jusqu'à l'hybridation.

C'est pour toutes ces raisons qu'il faut considérer ce travail comme le début de l'apprentissage de la technique de PCR dans notre laboratoire.

Certains points peuvent cependant sembler acquis, comme la mise au point de la PCR proprement dite avec :

le traitement de l'échantillon à son arrivée.

l'extraction de l'ADN

l'amplification de la réaction.

En effet, les résultats obtenus avec nos témoins sont reproductibles et d'une sensibilité correcte, suffisamment proche de la quantité de parasites que l'on peut espérer recueillir au sein d'un prélèvement.

La spécificité est elle aussi, satisfaisante.

Le principe de la technique, couplant deux PCR avec deux gènes différents, se retrouve chez d'autres auteurs.

L'absence de faux positifs est aussi un point non négligeable, indiquant que nous nous sommes entourés de solides précautions.

La présence d'un faux négatif est possible mais non certaine.

#### CEPENDANT, DES POINTS RESTENT À AMÉLIORER:

pour être certain de l'absence de faux négatifs, il faudrait :

- **Mettre au point la technique d'hybridation.** Il est peut-être un peu illusoire de penser mettre en routine une technique aussi lourde (elle n'est d'ailleurs pas utilisée actuellement dans la plupart des laboratoires réalisant une technique de PCR dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose). Il serait cependant intéressant de l'avoir à notre disposition pour les cas douteux. On peut aussi envisager de l'utiliser pendant une courte période en systématique, afin de voir si elle apporte un plus en terme de sensibilité.

- Rechercher, sur chaque échantillon à tester, la présence d'inhibiteurs soit à l'aide d'un témoin interne, soit à l'aide d'une autre PCR avec des amorces permettant l'amplification d'une nouvelle cible obligatoirement présente dans l'échantillon (par exemple : gène de la bêta globine ou gènes HLA).
- Augmenter notre expérience de la technique.

Il faut cependant être conscient que les résultats de la PCR dans le cadre de la toxoplasmose restent complémentaires des autres techniques à notre disposition et qu'ils ne les remplacent pas.

## ABRÉVIATIONS

Ac : anticorps

CI : charge immunitaire

HA : humeur aqueuse

ID : immunodéprimé

IRM : imagerie par résonance magnétique

LA : liquide amniotique

LBA : lavage broncho-alvéolaire

pb : paires de base

PBS : phosphate buffer saline

SF : sang foetal

TC : toxoplasmose cérébrale

TDM : tomodesitométrie

TEC : toxoplasmose extra cérébrale

TRT : traitement

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. AMBROISE-THOMAS et N. CRISTINA - Résultats et perspectives apportés par les sondes moléculaires et par l'amplification génique *in vitro* (PCR) dans la toxoplasmose  
*Bull. Acad. Natl. Méd.*, 1991, 175 : 39-49
- [2] S. ANGEL, E. MAERO, J. C. BLANCO, V. PZSENNY, C. ZALA, R. GONZALEZ, H. PERELMULTER et J. C. GARBERI - Early Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients by dot blot hybridization analysis  
*J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30 : 3286-3287
- [3] S. O. ANGEL, J. C. BLANCO, E. MAERO, V. PZSENNY et J. C. GARBERI - Repetitive DNA sequences of *Toxoplasma gondii* for development of diagnostic probes  
*Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1991, 86 : 483-484
- [4] F. AOUIZERATE, J. CAZENAVE, L. POIRIER, Ph. VERIN, A. CHEYROU, J.BEGUERET et F. LAGOUTTE - Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humour by the polymerase chain reaction.  
*Brit. J. Ophthalmol.*, 1993, 77 : 107-109
- [5] F. AOUIZERATE, J. CAZENAVE, L. POIRIER, Ph. VERIN, C. GERVAIS, F. LAGOUTTE et J.BEGUERET - Détection directe de toxoplasmes dans l'humeur aqueuse par amplification génique (PCR).  
*J. Fr. Ophtalmol.*, 1991, 14 : 550-555
- [6] E. BLOCH-MICHEL - Ocular toxoplasmosis - clinical aspect  
*Intern. Ophthalmol.*, 1990, 14 : 353-357
- [7] S. BRETAGNE, J. COSTA, M. VIDAUD, J. TRAN VAN NHIEU et J. FLEURY-FEITH - Detection of *toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples  
*J. Infect. Dis.*, 1993, 168 : 1585-1588
- [8] A. P. BRÉZIN, C. E. EQWUAGU, C. SILVEIRA, P. THULLIEZ, M. C. MARTINS, R. M. MAHDI, R. BELFORT et R. B. NUSSENBLATT - Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis  
*New Engl. J. of Med.*, 1993, 324 : 699

- [9] J. L. BURG, C. M. GROVER, P. POULETTY et J. C. BOOTHROYD - Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27, n° 8 : 1787-1792
- [10] J. L. BURG, D. PERELMAN, L. H. KASPER, P. L. WARE et J. C. BOOTHROYD - Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii* *J. Immunol.*, 1988, 141 : 3584-3591
- [11] E. CANDOLFI, B. ARVEILLER, J. L. MANDEL et T. KIENT - Structure du génome de *Toxoplasma gondii* . Premiers résultats. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1988, 6 : 27-32
- [12] J. CAZENAVE, M.-H. BESSIERES, D. SOURRUE, A. CHEYROU et J. BEGUERET - Détection de toxoplasmes par amplification d'ADN. Un exemple d'application des techniques de biologie moléculaire au diagnostic parasitaire *Rev. Fr. Lab.*, 1990, 209 : 118-126
- [13] J. CAZENAVE, A. CHEYROU, F. AOUIZERATE, L. POIRIER et Ph. VERIN - Detection of *Toxoplasma* in aqueous humour by using the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin.*, 1992, 50 : 357-358
- [14] J. CAZENAVE, A. CHEYROU, P. BLOUIN, A. M. JOHNSON et J. BEGUERET - Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma* *J. Clin. Pathol.*, 1991, 44 : 1037-1039
- [15] M. F. CESBRON-DELAUW et al. - Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86 : 7537-7541
- [16] C.-C. CHAN, A. G. PALESTINE, Q. LI et R. B. NUSSENBLATT - Diagnosis of ocular toxoplasmosis by the use of immunocytology and the polymerase chain reaction. *Am. J. Ophthalmol.*, 1994, 117 : 803-805
- [17] I. COCHEREAU-MASSIN, A. BRÉZIN et H. PELLOUX - Toxoplasmoses extra-cérébrales. Quels sont les éléments faisant suspecter ou affirmer une toxoplasmose oculaire ? *Méd. Mal. Infect.*, 1993, 23, spécial : 705-709

- [18] A. W. C. A. CORNELISSEN, J. P. OVERDULE et M. VAN DER PLOEG - Determination of nuclear DNA of five Eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in I. (T.)gondii.. *Parasitologie*, 1984, **88** : 13-25
- [19] N. CRISTINA, M. L. DARDÉ, C. BOUDIN, G. TAVERNIER, M. PESTRE-ALEXANDRE et P. AMBROISE-THOMAS - A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups  
*Parasitol. Res.*, 1994, **81** : 32-37
- [20] N. CRISTINA, F. DEROUIN, H. PELLOUX, R. PIERCE, M.F. CESBRON-DELAUWN et P. AMBROISE-THOMAS - Détection de *Toxoplasma gondii* chez des patients sidéens par la technique de " Polymerase Chain Reaction " (PCR), à l'aide de la séquence répétée TGR1<sub>E</sub>.  
*Path. Biol.*, 1992, **40** : 52-55
- [21] F. DAFFOS, F. FORESTIER, M. CAPELLA-PAVLOVSKY, P. THULLIEZ, C. AUFRANT, D. VALENTI et W. L. COX - Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis  
*New Engl. J. Med.*, 1988, **318** : 271-275
- [22] M. L. DARDÉ, B. BOUTEILLE et M. PESTRE-ALEXANDRE - Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and biological and epidemiological implications  
*J. Parasitol.*, 1992, **78** : 786-794
- [23] M. L. DARDÉ, H. RIAHI, B. BOUTEILLE et M. PESTRE-ALEXANDRE - Isoenzyme analysis of *Hammondia hammondi* and *Toxoplasma gondii* Sporozoites  
*J. Parasitol.*, 1992, **78**, n° 4 : 731-734
- [24] M. L. DARDÉ, M. SERVAUD, J. RENAUDIE, M. PESTRE-ALEXANDRE et la collaboration de nombreux pédiatres - Aspects actuels du diagnostic de la toxoplasmose congénitale. Expériences au CHU de LIMOGES - 1985 - 1992  
*Société médicale du Limousin - Faculté de médecine*, 1992

- [25] F. DEROUIN et P. THULLIEZ - Diagnostic biologique de la toxoplasmose  
*Laborama*, 33, supplément : 3-26
- [26] F. DEROUIN, Ph. THULLIEZ et Y. J. F. GARIN - Intérêt et limites de la sérologie de toxoplasmose chez les sujets VIH<sup>+</sup>  
*Pathol. Biol.*, 1991, 39 : 255-259
- [27] G. DESMONTS, J. COUVREUR et Ph. THULLIEZ - Toxoplasmose congénitale. Cinq cas de transmission à l'enfant d'une infection maternelle antérieure à la grossesse  
*Presse Méd.*, 1990, 19 : 1445-1449
- [28] J. DUPOUY-CAMET, S. LAVAREDA DE SOUZA, M. E. BOUGNOUX, L. MANDELBROT, C. HENNEQUIN, M. DOMMERGUES, R. BENAROUS et C. TOURTE-SCHAEFER - Preventing congenital toxoplasmosis  
*The Lancet*, 1990, 336 : 1017-1018
- [29] J. DUPOUY-CAMET, S. LAVAREDA de SOUZA, C. MASLO, A. PAUGAM, A. G. SAIMOT, R. BENAROUS, C. TOURTE-SCHAEFER et F. DEROUIN - Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31 : 1866-1869
- [30] G. N. DUTTON - the causes of tissue damage in toxoplasmic retinochoroiditis  
*Trans. Ophthalmol. soc. U.K.*, 1986, 105 : 404-412
- [31] M. J. ESPY, T. F. SMITH et D. H. PERSING - Dependence of Polymerase Chain Reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31 : 2361-2365
- [32] S. F. FARMLEY, F. D. GOEBEL et J. S. REMINGTON - Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30 : 3000-3002
- [33] G. A. FILICE, J. A. HITT, C. D. MITCHELL, M. BLACKSTAD et S. W. SORENSEN - Diagnosis of Toxoplasma Parasitemia in Patients with AIDS by Gene Detection after Amplification with Polymerase Chain Reaction  
*J. of Clin. Microbiol.*, 1993, 31 : 2327-2331

- [34] **B. FORTIER et F. AJANA** - Toxoplasme et toxoplasmoses  
*E. techniques, Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses, 8-509-A-10, Pédiatrie, 4-330-A-10, 1993, 10 p.*
- [35] **F. FOUDRINIER, D. AUBERT, P. LEMAIRE et J.M. PINON** - Implantation d'une technique de PCR appliquée à la détection d'ADN toxoplasmique au laboratoire de parasitologie du CHR de Reims. Intérêt et limites  
*Biologie prospective. Comptes rendus du 8<sup>eme</sup> colloque de Pont-à-Mousson, 1993, 109-112*
- [36] **J. K. FRENKEL** - Pathophysiology of toxoplasmosis  
*Parasitol. Today, 1988, 4 : 273-278*
- [37] **U. GROSS, A. ROGGENKAMP, K. JANITSCHKE et J. HEESEMANN** - Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens.  
*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1992, 11 : 33-39*
- [38] **C. M. GROVER, P. THULLIEZ, J. S. REMINGTON et J. C. BOOTHROYD** - Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid  
*J. Clin. Microbiol., 1990, 28 : 2297-2301*
- [39] **D. HARAS et J.-P. AMOROS** - Réaction de polymérisation en chaîne, sondes froides et diagnostic clinique  
*Cahiers Santé, 1994, 4 : 43-52*
- [40] **P. HOFMAN, E. BERNARD, J. F. MICHIELS, A. THYSS, Y. LE FICHOUX et R. LOUBIERE** - Extracerebral toxoplasmosis and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)  
*Path. Res. Pract., 1993, 189 : 894-901*
- [41] **P. HOHLFELD, F. DAFFOS, J. M. COSTA, P. THULLIEZ, F. FORESTIER et M. VIDAUD** - Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid  
*New Engl. J. Med., 1994, 331 : 695-699*
- [42] **A. M. JOHNSON, J. P. DUBEY et J. B. DAME** - Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA  
*Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1986, 64 : 351-355*

- [43] **A. M. JOHNSON, P.J. MURRAY, S. ILLANAS et P. R. BAVERSTOCK** - Rapid nucleotide sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii*: evolutionary implications for the Apicomplexa.  
*Mol. Biochem. Parasitol.*, 1987, **25** : 239-246
- [44] **J.-C. KAPLAN et M. DELPECH** - Biologie moléculaire et médecine  
*Ed. Médecine-Sciences Flammarion*, 1993, : 990 p.
- [45] **K. KHALIFA, A. ROTH, B. ROTH, K. N. ARASTEH et K. JANITSCHKE** - Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis  
*J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32** : 2813-2819
- [46] **S. KWOK et R. HIGUCHI** - Avoiding false positives with PCR  
*Nature*, 1989, **339** : 237-238
- [47] **C. LEPORT, P. AMBROISE-THOMAS, G. CHENE, F. DEROUIN, C. KATLAMA, F. RAFFI et J.L. VILDÉ** - Traitement d'attaque  
*Méd. Mal. Infect.*, 1993, **23**, spécial : 719-722
- [48] **U. LINZ, U. DELLING et H. RÜBSAMEN-WAIGMANN** - Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction  
*J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1990, **28** : 5-13
- [49] **M. C. LONGO, M. S. BERNINGER et J. L. HARTLEY** - Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions.  
*Gene* 95, 1990, : 125-128
- [50] **V. N. LOPAREV, M. A. CARTAS, C. E. MONKEN, A. VELPANDI et A. SRINIVASAN** - An efficient and simple method of DNA extraction from the whole blood and cell lines to identify infectious agents  
*J. Virol. Methods*, 1991, **34** : 105-112
- [51] **B. J. LUFT et al** - Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome  
*New Engl. J. Med.*, 1993, **329** : 995-999

- [52] R. M. MANNERS, S. O' CONNELL, E. C. GUY, D. H. M. JOYNSON, C. R. CANNING et D. E. ETCHELLES - Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of acquired ocular toxoplasmosis in an immunocompetent adult.  
*Brit. J. Ophthalmol.*, 1994, 78 : 583-584
- [53] T. MANNIATIS, E. F. FRITSH et J. SAMBROOK -  
Molecular cloning : a laboratory manual  
*C. S. H. L. Press*, Cold Spring harbor, New York
- [54] M. MARIOTTI, J.-J. LEFRERE et P. ROUGER - La technique de "Polymerase Chain Reaction" (PCR)  
*Spectra Biologie*, 1989, 89 : 45-47
- [55] C. MARX-CHEMLA, E. THELLIEZ, F. FOU DRINIER, D. AUBERT, A. BONHOMME, A. DUCASSE et J.-M. PINON -  
Toxoplasmose oculaire : mise en évidence de toxoplasmes libres dans l'humeur aqueuse  
*Presse Méd.*, 1993, 22 : 734
- [56] Th. MAY, J. C. LUCET, F. DEROUIN et V. TIRARD -  
Toxoplasmose pulmonaire et autres localisations (oculaires exclues). Sur quels critères cliniques, radiologiques et biologiques s'appuient ces diagnostics ?  
*Méd. Mal. Infect.*, 1993, 23, spécial : 709-715
- [57] S. D. NAGELS et J. C. BOOTHROYD - The  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns.  
*Mol. Biochem. Parasitol.*, 1988, 29 : 261-273
- [58] R. NORBY et T. EILARD - Recurrent toxoplasmosis  
*Scand. J. Infect. Dis.*, 1976, 8 : 275-276
- [59] R. B. NUSSENBLATT et R. BELFORT - Ocular toxoplasmosis - an old disease revisited  
*JAMA*, 1994, 271 : 304-307
- [60] L. OSTERGAARD, A. K. NIELSEN et F. T. BLACK -  
DNA amplification on cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral Toxoplasmosis among HIV-positive patients with signs or symptoms of neurological disease.  
*Scand. J. Infect. Dis.*, 1993, 25 : 227-237

- [70] **K. F. TABBARA** - Disruption of the choroidoretinal interface by *Toxoplasma*  
*Eye*, 1990, 4 : 366-373
- [71] **Ph. THULLIEZ et G. DESMONTS** - Toxoplasmose et grossesse  
*Le Concours Médical*, 1988, 110 : 3320-3326
- [72] **E. van de VEN, W. MELCHERS, J. GALAMA, W. CAMPS et J. MEUWISSEN** - Identification of *Toxoplasma gondii* infections by BI gene amplification  
*J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29 : 2120-2124
- [73] **H.-P. VOSBERG** - The polymerase chain reaction : an improved method for the analysis of nucleic acid.  
*Human Genetics*, 1989, 83 : 1-15
- [74] **J. M. WASTLING, S. NICOLL et D. BUXTON** - Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep.  
*J. Med. Microbiol.*, 1993, 38 : 360-365
- [75] **Sin-Yew WONG et Jack S. REMINGTON** - Toxoplasmosis in Pregnancy  
*Clinical Infectious Diseases*, 1994, 18 : 853-862



## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION .....	13
RAPPEL SUR TOXOPLASMA GONDII ET LA TOXOPLASMOSE HUMAINE .....	15
1. TAXONOMIE DE T. GONDII.....	15
2. CYCLE ÉVOLUTIF .....	15
2.1. Le cycle sexué .....	16
2.2. Le cycle asexué.....	16
3. ÉPIDÉMIOLOGIE.....	17
3.1. Prévalence .....	17
3.2. Réservoir de parasites .....	17
3.3. Modes de contamination .....	18
4. MORPHOLOGIE DE T. GONDII.....	18
4.1. le tachyzoïte (parfois appelé trophozoïte) .....	18
4.2. Le kyste et ses bradyzoïtes: .....	19
4.3. Oocystes et sporozoïtes.....	19
5. STRUCTURE BIOCHIMIQUE DE T. GONDII .....	19
5.1. Structure moléculaire.....	19
5.2. Différences moléculaires entre les souches de T. gondii .....	20
6. ÉVOLUTION D'UNE INFECTION TOXOPLASMIQUE.....	21
6.1. Évolution du parasite au sein de l'organisme.....	21
6.2. Immunité antitoxoplasmique .....	21
6.2.1. La réponse humorale .....	22
6.2.2. La réponse cellulaire.....	22
7. ASPECTS CLINIQUES DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE.....	23
7.1. Toxoplasmose acquise asymptomatique .....	23

7.2. Toxoplasmose symptomatique du sujet immunocompétent.....	23
7.2.1. Forme classique.....	23
7.2.2. Forme grave.....	23
7.2.3. Forme récurrente.....	23
7.3. Toxoplasmose de l'immunodéprimé.....	24
7.3.1. Toxoplasmose cérébrale (TC).....	24
7.3.2. Toxoplasmoses extracérébrales (TEC).....	25
7.4. Toxoplasmose congénitale.....	26
7.4.1. Risques de contamination fœtale.....	26
7.4.2. Signes cliniques.....	27
7.4.2.1. Forme asymptomatique à dépistage uniquement sérologique:.....	27
7.4.2.2. Forme symptomatique :.....	27
7.5. Toxoplasmose oculaire.....	28
7.5.1. Physiopathologie.....	28
7.5.2. Signes cliniques.....	28
8. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....	29
8.1. Méthodes.....	29
8.1.1. Mise en évidence directe du parasite.....	29
8.1.2. Sérologie [25].....	29
8.1.2.1. Techniques détectant des anticorps dirigés contre les antigènes membranaires (techniques les plus précoces)...	30
8.1.2.2. Techniques détectant les anticorps dirigés contre les antigènes solubles obtenus après lyse du toxoplasme.....	31
8.1.3. Calcul des charges immunitaires.....	32
8.1.4. La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) appliquée à la toxoplasmose.....	32
8.2. Conduite à tenir sur le plan paraclinique selon le diagnostic évoqué .....	32
8.2.1. Toxoplasmose congénitale.....	32
8.2.2. Toxoplasmose oculaire.....	34
8.2.3. Toxoplasmose de l'immunodéprimé.....	35
9. TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE.....	36

9.1. Spécialités actives.....	36
9.1.1. Macrolides et apparentés .....	36
9.1.2. Inhibiteurs de la synthèse des purines.....	37
9.1.3. Autres molécules .....	38
9.2. Indications thérapeutiques.....	38
9.2.1. Toxoplasmose congénitale .....	38
9.2.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé.....	39
9.2.3. Toxoplasmose oculaire.....	40
<b>LA PCR.....</b>	<b>41</b>
1. GÉNÉRALITÉS SUR LA PCR.....	41
1.1. Bref rappel sur l'ADN .....	41
1.2. Définition de la PCR .....	41
1.3. Principe.....	42
1.3.1. Les composants de la réaction PCR.....	45
1.3.2. Les principaux problèmes courants de la PCR .....	46
1.3.3. La révélation de la réaction .....	49
1.4. Les applications générales de la PCR.....	50
2. APPLICATION DE LA PCR À LA TOXOPLASMOSE.....	50
2.1. Les différentes cibles.....	50
2.1.1. Le gène B1 .....	51
2.1.2. le gène rDNA.....	51
2.1.3. Le gène TGR1E .....	52
2.1.4. Le gène de la P30 .....	52
2.1.5. Le gène ABGTg 4 .....	53
2.2. Le déroulement de la réaction de PCR dans le cadre de la recherche de toxoplasmes .....	53
2.3. Étude des résultats publiés sur la PCR appliquée à la toxoplasmose.....	54
2.3.1. Dans le cas d'une toxoplasmose oculaire:.....	54
2.3.2. Dans le cas d'une toxoplasmose congénitale: .....	56
2.3.3. Dans le cas d'une toxoplasmose chez l'immunodéprimé: ...	58

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>66</b>
1. MATÉRIEL .....	66
1.1. Les patients .....	66
1.2. Les témoins positifs.....	73
1.3. Les témoins négatifs.....	75
2. MÉTHODE .....	75
2.1. Traitement et conservation des prélèvements .....	75
2.1.1. Prélèvement de sang : séparation des granulocytes .....	75
2.1.2. Humeur aqueuse .....	76
2.1.3. Liquide amniotique.....	76
2.2. Extraction de l'ADN d'après la technique décrite par LOPAREV et coll.....	76
2.3. Vérification de la quantité d'ADN extrait.....	77
2.4. Préparation de la PCR.....	78
2.4.1. Réactifs .....	78
2.4.2. Amplification.....	79
2.4.3. Révélation après électrophorèse en gel d'agarose à 3% .....	80
2.4.3.1. Les produits utilisés.....	80
2.4.3.2. La migration.....	80
2.4.3.3. La lecture.....	81
2.5. Quelques remarques concernant les précautions prises pour éviter les contaminations.....	81
<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>83</b>
1. MISE AU POINT DE LA PCR.....	83
1.1. Évaluation de la sensibilité de la PCR.....	83
1.2. Évaluation de la spécificité de la PCR vis à vis des différentes souches de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	84
1.3. Comparaison de deux techniques d'extraction de l'ADN.....	84
1.4. Évaluation de l'effet de l'UNG sur la PCR.....	84

2. RÉSULTATS DES PCR EFFECTUÉES SUR LES DIVERS PRÉLÈVEMENTS PATHOLOGIQUES .....	85
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>92</b>
1. DISCUSSION SUR LA MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE PCR .....	92
1.1. Interprétation de la sensibilité de la PCR .....	92
1.2. Interprétation de la spécificité de la PCR.....	92
1.3. Interprétation de la comparaison des 2 techniques d'extraction de l'ADN .....	93
1.4. Interprétation de l'effet de l'UNG sur la PCR.....	93
2. DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS SUR NOS PRÉLÈVEMENTS .....	93
2.1. Liquides amniotiques.....	93
2.2. Humeurs aqueuses.....	94
2.3. Sangs de sujets immunodéprimés .....	95
2.3.1. Groupe de patients suspects d'une toxoplasmose évolutive.	95
2.3.2. Groupe de témoins négatifs.....	97
2.4. Remarque .....	97
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>98</b>
<b>ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>102</b>



## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

*En présence de mes maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

*Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*

*Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.*

*Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.*

*Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.*

ON A IMPRIMER N° 16

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER  
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

## RÉSUMÉ

La toxoplasmose, qui reste grave chez la femme enceinte (avec les problèmes de toxoplasmose congénitale) connaît, depuis quelques années, à cause du SIDA, un regain d'intérêt.

Face aux manifestations de la maladie, les nombreux moyens d'analyse biologique restent encore insuffisants.

C'est pourquoi nous avons cherché à mettre au point une technique de biologie moléculaire, la PCR (Polymerase chain reaction), appliquée à la toxoplasmose.

Nous l'avons expérimentée sur différents témoins préparés avec des souches de *Toxoplasma gondii* entretenues au laboratoire, puis sur des ponctions de liquide amniotique, d'humeur aqueuse et des prélèvements de sang.

Nos résultats ne peuvent encore se comparer à ceux décrits dans la littérature, mais la PCR se révèle une technique rapide, sensible et spécifique et devrait, au fur et à mesure de son développement, apporter une contribution intéressante au diagnostic de la toxoplasmose.

### Mots-clés

Toxoplasmose

Polymerase chain reaction

SIDA

Grossesse