



**HAL**  
open science

# Détection et quantification de *Toxoplasma gondii* par PCR en temps réel : adaptation d'une PCR classique pour l'amplification du gène B1 avec les amorces JW 58 et JW 59

Virginie Morand-Bui

► **To cite this version:**

Virginie Morand-Bui. Détection et quantification de *Toxoplasma gondii* par PCR en temps réel : adaptation d'une PCR classique pour l'amplification du gène B1 avec les amorces JW 58 et JW 59. Sciences pharmaceutiques. 2005. dumas-01236501

**HAL Id: dumas-01236501**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01236501>**

Submitted on 1 Dec 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



*1<sup>er</sup> exemplaire*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2005

N° **7013**

**Détection et quantification de *Toxoplasma gondii***  
**par PCR en temps réel**  
**Adaptation d'une PCR classique pour l'amplification du gène B1**  
**avec les amorces JW 58 et JW 59**

MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE  
Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

Présenté à la faculté de Pharmacie de GRENOBLE  
et soutenu publiquement le 19 mai 2005  
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : Virginie MORAND-BUI  
Née le : 8 avril 1978 à Saint Symphorien sur Coise

**JURY :**

Président : Madame R. Grillot, Professeur de Pharmacie  
Membres : Monsieur H. Pelloux, Professeur de Médecine  
Madame M. P. Brenier-Pinchart, Docteur en Médecine  
Madame V. Equy, Docteur en Médecine  
Madame H. Fricker-Hidalgo, Docteur en Pharmacie



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2005

N°

**Détection et quantification de *Toxoplasma gondii***  
**par PCR en temps réel**  
**Adaptation d'une PCR classique pour l'amplification du gène B1**  
**avec les amorces JW 58 et JW 59**

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

Présenté à la faculté de Pharmacie de GRENOBLE  
et soutenu publiquement le 19 mai 2005  
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : Virginie MORAND-BUI

Née le : 8 avril 1978 à Saint Symphorien sur Coise

**JURY :**

Président : Madame R. Grillot, Professeur de Pharmacie

Membres : Monsieur H. Pelloux, Professeur de Médecine

Madame M. P. Brenier-Pinchart, Docteur en Médecine

Madame V. Equy, Docteur en Médecine

Madame H. Fricker-Hidalgo, Docteur en Pharmacie



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur **P. DEMENGE**  
Vice-Doyenne : Mme **A. VILLET**

**PROFESSEURS DE PHARMACIE**

<b>BAKRI</b>	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
<b>BENOIT-GUYOD</b>	Jean-Louis	(Emérite)
<b>BURMEISTER</b>	Wilhelm	Biophysique
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-Technique
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Bio-Inorganique
<b>DEMENGE</b>	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie
<b>FAVIER</b>	Alain	Biochimie / Biotechnologie
<b>GOULON</b>	Chantal	Biophysique
<b>GRILLOT</b>	Renée	Parasitologie
<b>LECLERC</b>	Gérard	Chimie Organique
<b>MARIOTTE</b>	Anne-Marie	Pharmacognosie
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie Analytique
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie / Pharmacologie
<b>ROUSSEL</b>	Anne-Marie	Biochimie
<b>SEIGLE-MURANDI</b>	Françoise	Botanique et Cryptogamie
<b>STEIMAN</b>	Régine	Biologie Cellulaire
<b>WOUESSIDJEW</b>	Denis	Pharmacie Galénique

**PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)**

<b>CHAMPON</b>	Bernard	Pharmacie Clinique
----------------	---------	--------------------

## MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie
<b>ALLENET</b>	Benoit	Pharmacie Clinique
<b>BARTOLI</b>	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotechn.
<b>BOUMENDJEL</b>	Ahcène	Pharmacognosie
<b>CARON</b>	Cécile	Biologie Moléculaire
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie et génie de la formulation
<b>DELETRAZ</b>	Martine	Droit Pharmaceutique Economie
<b>DEMEILLERS</b>	Christine	Biochimie
<b>DESIRE</b>	Jérôme	Chimie Bioorganique
<b>DIJOUX-FRANCA</b>	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Virologie
<b>ESNAULT</b>	Danielle	Chimie Analytique
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie
<b>FAURE-JOYEUX</b>	Marie	Physiologie-Pharmacologie
<b>FOUCAUD-GAMEN</b>	Jacqueline	Immunologie
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
<b>GERMI</b>	Raphaële	Bactériologie
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie Thérapeutique
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie – Pharmacologie
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie Analytique
<b>GUIRAUD</b>	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Botanique – Cryptogamie
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Organique / Chimie Thérapeutique
<b>PINEL</b>	Claudine	Parasitologie
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique
<b>RICHARD</b>	Jean-Michel	
<b>RIONDEL</b>	Jacqueline	Physiologie - Pharmacologie
<b>SEVE</b>	Michel	Ens. Physique / Rech. Biochimie
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie Bio-Inorganique
<b>VILLEMAIN</b>	Danielle	Mathématiques / Informatique
<b>VILLET</b>	Annick	Chimie Analytique

### PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

<b>ROUTABOUL</b>	Christel	Chimie Générale
------------------	----------	-----------------

Au Président du jury,

**Madame le Professeur R. Grillot**

C'est un grand honneur que vous me faites en acceptant la présidence de ce jury, veuillez trouver ici le témoignage de mes sincères remerciements et de mon grand respect.

Aux membres du jury,

**Monsieur le Professeur H. Pelloux**

Je vous remercie très sincèrement de faire partie de ce jury et de m'avoir accueilli à deux reprises dans votre laboratoire. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance.

**Madame le Docteur M. P. Brenier-Pinchart**

Merci d'avoir été le fil conducteur de ce travail ; merci de m'avoir aidé, conseillé et encouragé tout au long de ma thèse.

**Madame le Docteur V. Equy**

Vous avez accepté de faire partie de ce jury et d'apporter votre expérience de clinicien, je vous en remercie sincèrement.

**Madame le Docteur H. Fricker-Hidalgo**

Tous mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail et pour toute l'aide apportée lors de sa réalisation.

Je tiens à remercier également :

Madame Josiane Simon pour toute l'aide apportée au cours de ce travail, pour ses nombreux et précieux conseils, pour sa gentillesse et sa grande disponibilité.

Mesdames C. Barois, M. P. Gili et C. Mur pour leur participation dans ce travail dans le recueil des toxoplasmes et surtout pour leur gentillesse.

Monsieur le Professeur J. M. Seigneurin (laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble) pour m'avoir permis la réalisation de ce travail grâce à l'utilisation du LightCycler dans son laboratoire.

Tous les membres du laboratoire de Parasitologie-Mycologie pour leur gentillesse et leur bonne humeur ; je garderai de très bons souvenirs de mes deux semestres passés avec vous tous.

Madame le Docteur D. Ponard (laboratoire d'Immunologie du CHU de Grenoble) pour m'avoir laissé du temps pour la réalisation de ce travail mais surtout pour son soutien, son écoute et ses encouragements constants.

Marine et Ariane, mes deux co-internes durant ces six derniers mois pas toujours faciles, merci pour tout...

Tous les internes en biologie de Grenoble pour leur bonne humeur et leur sympathie. Je vous souhaite de belles choses à tous. Un grand merci en particulier à celles déjà parties : Florence, Nathalie et Laetitia (sans oublier Farid, Nicolas et Christophe) ; votre accueil à Grenoble a été extraordinaire, jamais je n'oublierai...

Claire et Delphine pour être toujours là, depuis les révisions de l'internat jusqu'à aujourd'hui.



**A Maxime,**

**A mes parents,**

**A Patricia et Mickaël,**

**A Stéphanie et sa famille,**

## ABREVIATIONS

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ARN** : acide ribonucléique

**Cp** : cycle seuil (crossing point)

**E** : efficacité d'amplification

**ELIFA** : enzyme linked immunofiltration assay

**ELISA** : enzyme linked immunosorbent assay

**FRET** : fluorescence resonance energy transfer

**HAART** : highly antiretroviral therapy (thérapie antirétrovirale hautement active)

**IFI** : immunofluorescence indirecte

**IFN  $\gamma$**  : interféron  $\gamma$

**Ig** : immunoglobuline

**IL 12** : interleukine 12

**ISAGA** : IgM immunosorbent agglutination assay

**LBA** : liquide de lavage broncho-alvéolaire

**LCR** : liquide céphalorachidien

**NK** : natural killer

**PBS** : phosphate buffer saline

**PCR** : polymerase chain reaction

**RT-PCR** : real time polymerase chain reaction

**SIDA** : syndrome d'immunodéficience acquise

**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>5</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>7</b>
<b>1. LA TOXOPLASMOSE</b> .....	<b>8</b>
1.1 HISTORIQUE.....	8
1.2 TAXONOMIE.....	9
1.3 MORPHOLOGIE DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	9
1.3.1 <i>Le tachyzoïte</i> .....	10
1.3.2 <i>Le bradyzoïte</i> .....	10
1.3.3 <i>Le sporozoïte</i> .....	11
1.4 CYCLE PARASITAIRE.....	11
1.4.1 <i>Chez l'hôte définitif</i> .....	11
1.4.2 <i>Chez l'hôte intermédiaire</i> .....	12
1.5 MODES DE CONTAMINATION ET EPIDEMIOLOGIE.....	13
1.6 PHYSIOPATHOLOGIE ET IMMUNITE ANTI-TOXOPLASMIQUE.....	15
1.7 FORMES CLINIQUES DE LA TOXOPLASMOSE.....	16
1.7.1 <i>La toxoplasmose acquise du patient immunocompétent</i> .....	16
1.7.2 <i>La toxoplasmose congénitale</i> .....	16
1.7.3 <i>La toxoplasmose du patient immunodéprimé</i> .....	17
1.8 DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE.....	18
1.8.1 <i>L'exploration du statut sérologique</i> .....	18
1.8.2 <i>La mise en évidence du parasite</i> .....	19
1.8.3 <i>L'imagerie médicale</i> .....	20
1.8.4 <i>La conduite du diagnostic de la toxoplasmose congénitale</i> .....	20
1.9 TRAITEMENT ET PREVENTION.....	23
<b>2. LA PCR EN TEMPS REEL</b> .....	<b>25</b>
2.1 PRINCIPES DE LA PCR EN TEMPS REEL.....	25
2.1.1 <i>Détection par un agent intercalant, le SYBR Green I</i> .....	25
2.1.2 <i>Détection par des sondes</i> .....	27
2.2 PRINCIPE DE LA QUANTIFICATION.....	31
2.3 APPAREILS DE DETECTION.....	33
2.4 INTERETS ET APPLICATIONS DE LA PCR EN TEMPS REEL.....	34

<b>3. APPLICATION DE LA PCR EN TEMPS REEL AU DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE.....</b>	<b>35</b>
3.1 PROTOCOLES DECRITS DANS LA LITTERATURE.....	35
3.2 APPLICATION DE LA PCR EN TEMPS REEL AU DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE .....	38
3.3 APPLICATION DE LA PCR EN TEMPS REEL AU DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE DU PATIENT IMMUNODEPRIME .....	40
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>45</b>
<b>1. OBTENTION DES TOXOPLASMES .....</b>	<b>46</b>
1.1 SOUCHE RH.....	46
1.2 SOUCHE PRUGNAUD .....	47
<b>2. EXTRACTION DE L'ADN DE <i>T. GONDII</i>.....</b>	<b>47</b>
2.1 METHODE CLASSIQUE PHENOL/CHLOROFORME.....	47
2.2 METHODE RAPIDE PAR EBULLITION.....	48
2.3 «QIAAMP DNA MINI KIT » (QIAGEN) .....	48
2.4 DOSAGE DE L'ADN .....	49
<b>3. AMPLIFICATION DE L'ADN DE <i>T. GONDII</i> PAR PCR EN TEMPS REEL.....</b>	<b>49</b>
3.1 AMPLIFICATION DU GENE B1 PAR LES AMORCES JW 58 ET JW 59.....	50
3.1.1 <i>Amorces et sondes</i> .....	50
3.1.2 <i>Le contrôle interne</i> .....	51
3.1.3 <i>Conditions d'amplification</i> .....	51
3.2 AMPLIFICATION DU GENE DE 529 BASES.....	53
3.2.1 <i>Amorces et sondes</i> .....	53
3.2.2 <i>Le contrôle interne</i> .....	54
3.2.3 <i>Conditions d'amplification</i> .....	54
3.3 DETECTION DES AMPLIFICATIONS PAR LE LIGHTCYCLER® .....	56
3.3.1 <i>Détection par le SYBR Green I</i> .....	56
3.3.2 <i>Détection par les sondes FRET en tandem</i> .....	56
<b>4. EVALUATION DES CARACTERISTIQUES DE LA PCR EN TEMPS REEL..</b>	<b>57</b>
4.1 LES DROITES D'ETALONNAGE.....	57

4.1.1	<i>Préparation de la gamme d'étalonnage à partir de dilutions d'ADN ...</i>	57
4.1.2	<i>Préparation de la gamme d'étalonnage à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes.....</i>	57
4.1.3	<i>Validation des droites d'étalonnage .....</i>	58
4.2	REPRODUCTIBILITE DE LA PCR EN TEMPS REEL.....	59
4.3	SPECIFICITE DE LA PCR EN TEMPS REEL.....	59
4.4	AMPLIFICATION DE LA SOUCHE PRUGNIAUD .....	60
<b>5.</b>	<b>EVALUATION DE LA PCR SUR DES PRELEVEMENTS ARTIFICIELS DE LIQUIDE AMNIOTIQUE.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>PROTOCOLES .....</b>	<b>61</b>
6.1	PCR EN TEMPS REEL AVEC LES AMORCES JW 58 ET JW 59 .....	61
6.2	PCR EN TEMPS REEL AVEC LES AMORCES TG F ET TG R .....	61
<b>RESULTATS .....</b>		<b>62</b>
<b>1.</b>	<b>PCR EN TEMPS REEL AVEC LES AMORCES JW 58 ET JW 59 .....</b>	<b>63</b>
1.1	OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PCR AVEC LE SYBR GREEN I .....	63
1.1.1	<i>Optimisation de la concentration finale en amorces .....</i>	63
1.1.2	<i>Introduction du contrôle interne.....</i>	65
1.1.3	<i>Optimisation de la température d'hybridation .....</i>	65
1.1.4	<i>Droite d'étalonnage en SYBR Green I.....</i>	67
1.2	PCR EN TEMPS REEL AVEC DETECTION PAR LES SONDAS EN TANDEM .....	68
1.2.1	<i>Les sondes FRET en tandem.....</i>	68
1.2.2	<i>Optimisation du nombre de copies de contrôle interne .....</i>	69
1.2.3	<i>Mise au point de la droite d'étalonnage à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes.....</i>	71
1.3	CARACTERISTIQUES DE LA PCR EN TEMPS REEL .....	75
1.3.1	<i>Caractéristiques des droites d'étalonnage .....</i>	75
1.3.2	<i>Reproductibilité de la PCR en temps réel.....</i>	75
1.3.3	<i>Spécificité de la PCR en temps réel.....</i>	77
1.3.4	<i>Amplification de la souche Prugnauud .....</i>	77
1.4	EVALUATION DE LA PCR SUR DES ECHANTILLONS ARTIFICIELS .....	77
<b>2.</b>	<b>PCR EN TEMPS REEL AVEC LES AMORCES TG F ET TG R.....</b>	<b>79</b>
2.1	DETECTION DES AMPLIFICATIONS PAR LE SYBR GREEN I .....	79

2.1.1 Etalonnage à partir de dilutions d'ADN de <i>T. gondii</i> .....	79
2.1.2 Ajout du contrôle interne : la $\beta$ globine .....	80
2.2 DETECTION DES AMPLIFICATIONS PAR LES SONDAS FRET EN TANDEM.....	81
2.2.1 Mise au point de la droite d'étalonnage à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes.....	81
2.2.2 Etalonnage sans la $\beta$ globine.....	82
2.2.3 Optimisation de la concentration des sondes FRET.....	83
2.2.4 Optimisation de la température d'hybridation .....	83
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>98</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>101</b>

---

# Introduction

La toxoplasmose est une parasitose répandue causée par un protozoaire ubiquitaire, *Toxoplasma gondii*. Elle est le plus souvent bénigne pour le sujet immunocompétent chez lequel le diagnostic peut être facilement établi par la recherche d'anticorps antitoxoplasmiques. Toutefois, cette infection représente un problème de santé publique pour deux populations : les femmes enceintes non prémunies et les patients immunodéprimés. En effet, la toxoplasmose congénitale et la toxoplasmose du patient immunodéprimé restent deux formes potentiellement graves et fréquentes de l'infection par *T. gondii*.

En cas de séroconversion chez une femme enceinte, la recherche d'une transmission foetale par diagnostic anténatal sur liquide amniotique est fondamentale car elle conditionne l'instauration d'un traitement spécifique et adapté diminuant le risque de séquelles foetales graves (Foulon *et al*, 1999). Les méthodes classiques de mise en évidence de *T. gondii* dans le liquide amniotique (inoculation à la souris, culture cellulaires et examen direct) manquent de sensibilité ou demandent un délai de réponse long. Au cours de ces dernières années, le diagnostic anténatal a pu cependant être amélioré grâce à la PCR réalisée sur le liquide amniotique (Hohlfeld *et al*, 1994). Actuellement, plusieurs protocoles de PCR en temps réel (RT-PCR) sont décrits pour la détection et la quantification de *T. gondii* mais encore peu d'études cliniques ont été réalisées afin de démontrer l'intérêt de quantifier la charge parasitaire dans le liquide amniotique. Cependant, d'après les premiers travaux effectués, il semblerait qu'il existe un lien entre la charge parasitaire dans le liquide amniotique et la gravité des séquelles foetales (Costa *et al*, 200 ; Ordinaire *et al*, 2005 ; Romand *et al*, 2004).

Après un rappel des connaissances actuelles sur la toxoplasmose et sur la PCR en temps réel, nous analyserons l'intérêt de cette technique dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale et dans le diagnostic de la toxoplasmose du patient immunodéprimé à partir des études cliniques publiées dans la littérature.

Dans un deuxième temps, nous décrivons le travail réalisé : nous avons développé une PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *T. gondii* dans le liquide amniotique à partir d'une PCR utilisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble (Pelloux *et al*, 1996). En parallèle, une deuxième PCR en temps réel amplifiant un autre gène cible récemment découvert et répété 200 à 300 fois dans le génome de *T. gondii* a été partiellement mise au point (Homan *et al*, 2000).

Enfin, après avoir présenté les résultats, ces derniers seront discutés et confrontés aux données de la littérature.



---

# **Synthèse bibliographique**

# 1. La toxoplasmose

## 1.1 Historique

L'histoire retient principalement les travaux de Charles Nicolle et Louis Herbert Manceaux qui découvrirent en 1908 à l'institut Pasteur à Tunis le parasite chez un rongeur sauvage du sud tunisien, le gondi (*Ctenodactylus gondii*). Ils le nommèrent *Toxoplasma gondii* en référence aux mots grecs *toxon* (arc) et *plasma* (forme). Cette découverte fut présentée le 26 octobre 1908 à l'Académie des Sciences de Paris par Laveran. A peu près au même moment, Alfonso Splendore isola également ce parasite à Sao Paulo à la suite de la mort de lapins dans son laboratoire (Cox, 2002).

Samuel Taylor Darling évoqua alors la possibilité de retrouver ce micro-organisme chez l'homme mais il faut attendre 1937 pour que le premier cas humain soit décrit par Wolf et Cowen. Il s'agissait d'un nouveau-né décédé à la suite d'une encéphalomyélite aiguë (Cox, 2002). Quelques années plus tard, la transmission materno-fœtale et la toxoplasmose congénitale seront reconnues.

Par la suite, de multiples travaux identifièrent les diverses formes de la maladie et des techniques de détection sérologique se développèrent comme, par exemple, le Dye Test ou test de lyse de Sabin et Feldman en 1948 ou le test de Remington en 1968 (Remington *et al*, 1968).

Toutefois, ce n'est qu'en 1970 que le cycle de *T. gondii* est entièrement compris par Hutchinson qui identifia le dernier maillon manquant à la chaîne épidémiologique : le chat est alors reconnu comme l'hôte définitif du parasite et le pouvoir infestant des fèces du chat est démontré (Hutchinson *et al*, 1970). Au début des années 1980, *T. gondii* trouve un nouveau cadre pathologique avec l'arrivée des premiers cas de SIDA (Luft *et al*, 1983) : dès 1983 des toxoplasmoses encéphalitiques gravissimes sont décrites et en 1984 *T. gondii* est reconnu comme un pathogène opportuniste chez les patients sidéens.

Au cours de ces 20 dernières années, le problème de la maîtrise de la transmission materno-fœtale fut posé et de nombreux travaux permirent d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des toxoplasmoses congénitales. Enfin, la prévention, le diagnostic et le traitement des toxoplasmoses du patient immunodéprimé restent encore des sujets de recherche d'actualité.

## 1.2 Taxonomie

*T. gondii* est un protozoaire opportuniste intracellulaire strict appartenant au phylum des *Apicomplexa* et à la classe des *Coccidia* (Montoya *et al*, 2004).

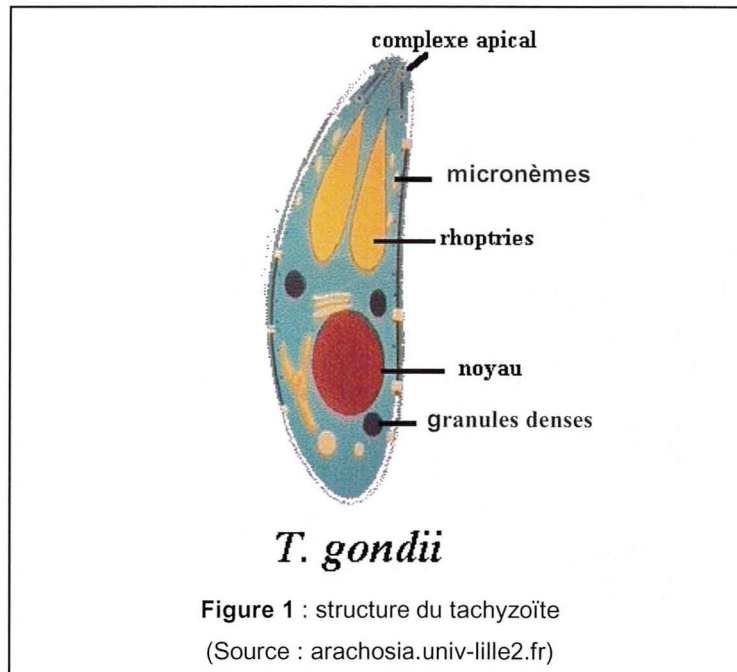
Le genre *Toxoplasma* ne possède qu'une seule espèce cependant, au sein de cette unique espèce, il existe trois groupes génétiques se distinguant en particulier par leur virulence (Howe *et al*, 1995). La classification dans l'une de ces lignées est fonction de la virulence de la souche dans le modèle murin. Ainsi, les souches de type I sont très virulentes pour la souris alors que les souches II et III déterminent plutôt chez cet animal une infection chronique. Les divergences génétiques qui sont à la base de ces différences sont en cours d'identification (Sibley *et al*, 2002 ; Su *et al*, 2002 ; Tinti *et al*, 2003). Par contre, il n'y a pas de différences de répartition géographique ni de spécificité d'hôtes pour ces trois lignées clonales.

En pathologie humaine les souches de type II prédominent chez les patients immunodéprimés ainsi que chez les enfants atteints de toxoplasmosse congénitale (Ajzenberg *et al*, 2002 ; Switaj *et al*, 2005).

## 1.3 Morphologie de *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* se présente sous trois formes évolutives se succédant pour réaliser un cycle complexe : le tachyzoïte (ou forme végétative), le bradyzoïte et le sporozoïte.

### 1.3.1 Le tachyzoïte



Il a la forme d'un croissant ou d'un arc de 4 à 8  $\mu\text{m}$  de long et représente la forme proliférative et virulente du parasite (Montoya *et al*, 2004). Son extrémité postérieure est arrondie tandis que l'extrémité antérieure effilée présente l'appareil de pénétration appelé complexe apical (figure 1). Le tachyzoïte contient de nombreux organites mis en évidence par microscopie électronique. Lors de la phase aiguë de l'infection, il pénètre activement dans les cellules, en particulier les cellules du système réticulohistiocytaire grâce à son complexe apical (Sibley, 2004). A l'intérieur des cellules, la multiplication des tachyzoïtes est très rapide et se réalise par endodyogénie. Lorsque la cellule contient plusieurs tachyzoïtes, elle est lysée ce qui permet l'invasion des cellules voisines par les tachyzoïtes ainsi libérés et leur dissémination dans l'ensemble de l'organisme infesté (Carruthers, 2002).

### 1.3.2 Le bradyzoïte

Sous la pression de la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte infesté, une interconversion se produit transformant les tachyzoïtes en bradyzoïtes. Ces derniers ont une structure proche de celle du tachyzoïte mais sont un peu plus petits, leur multiplication est plus lente et leur métabolisme est ralenti (Dzierszinski *et al*, 2004). Protégés par la membrane épaisse et résistante d'un kyste, ils constituent la forme de latence du parasite et

peuvent persister pendant toute la vie de l'hôte. Le kyste dont la taille est comprise entre 15 et 100 µm se développe à partir du cytoplasme de la cellule hôte et peut contenir plusieurs milliers de bradyzoïtes (Montoya *et al*, 2004). Ils sont retrouvés dans tous les tissus, en particulier dans le cerveau et les muscles. Ils représentent une des formes de dissémination et de résistance du parasite car ils ne sont pas détruits par des températures inférieures à 45°C ni par l'acide chlorhydrique permettant ainsi la contamination humaine par ingestion de viande (Dubey, 1998).

### 1.3.3 Le sporozoïte

Cette forme résulte de la multiplication sexuée du parasite qui a lieu dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle de l'hôte définitif c'est à dire le chat. L'ocyste qui résulte de cette multiplication est émis dans les fèces du chat sous forme non sporulée. La sporulation aboutit à la formation de deux sporocystes de 6 à 8 µm de diamètre contenant chacun quatre sporozoïtes. Le sporozoïte a une structure comparable à celle du tachyzoïte (Dubey, 1998). L'ocyste sporulé, particulièrement résistant dans le milieu extérieur, est donc infestant et constitue une des formes de dissémination du parasite entre ses différents hôtes.

## 1.4 Cycle parasitaire

Le cycle de *T. gondii* comprend deux phases : une phase de multiplication sexuée survenant chez l'hôte définitif (le chat) qui aboutit à la formation d'ocystes et une phase de multiplication asexuée se déroulant chez les hôtes intermédiaires dont l'homme fait partie (figure 2).

### 1.4.1 Chez l'hôte définitif

Le chat s'infecte en ingérant des kystes contenus dans ses proies (oiseaux, souris...) ou des ocystes qui souillent l'environnement. Les bradyzoïtes ou les sporozoïtes sont libérés dans le tube digestif et envahissent les entérocytes. Après plusieurs cycles de reproduction asexuée, un cycle de multiplication sexuée est réalisé et des millions

d'oocystes sont produits puis éliminés dans les fèces du chat. L'excrétion d'oocystes a lieu 3 à 10 jours après l'ingestion de kystes et 18 jours environ après l'ingestion d'oocystes. L'oocyste sporule en 1 à 21 jours en fonction des conditions extérieures et peut rester infectant pendant plus de un an si l'environnement est favorable. Il peut alors être ingéré par un nouvel hôte, soit le chat soit un hôte intermédiaire (Dubey, 1998).

#### 1.4.2 Chez l'hôte intermédiaire

Des hôtes intermédiaires très divers peuvent s'infecter avec des oocystes sporulés ou des kystes contenus dans les aliments (viande) : les oiseaux, les mammifères omnivores ou carnivores et les hommes. Les sporozoïtes ou bradyzoïtes libérés dans le tube digestif deviennent alors dans les cellules intestinales des tachyzoïtes qui se multiplient activement et disséminent dans l'organisme infesté lors de la phase aiguë de l'infection. Une parasitémie peut ainsi être détectée chez la souris 4 heures après l'ingestion d'oocystes (Dubey, 1998). Puis les tachyzoïtes se transforment au bout de 7 à 10 jours en bradyzoïtes se développant à l'intérieur de formations kystiques dans certains tissus, en particulier dans le système nerveux central, les poumons et les muscles. Ces kystes vont survivre plusieurs mois, voire plusieurs années, peut-être même pendant toute la vie de l'hôte ; il s'agit de la phase chronique de l'infection. Ils assurent ainsi la transmission du parasite parmi les hôtes intermédiaires ainsi que l'infection de l'hôte définitif (Black *et al*, 2000).

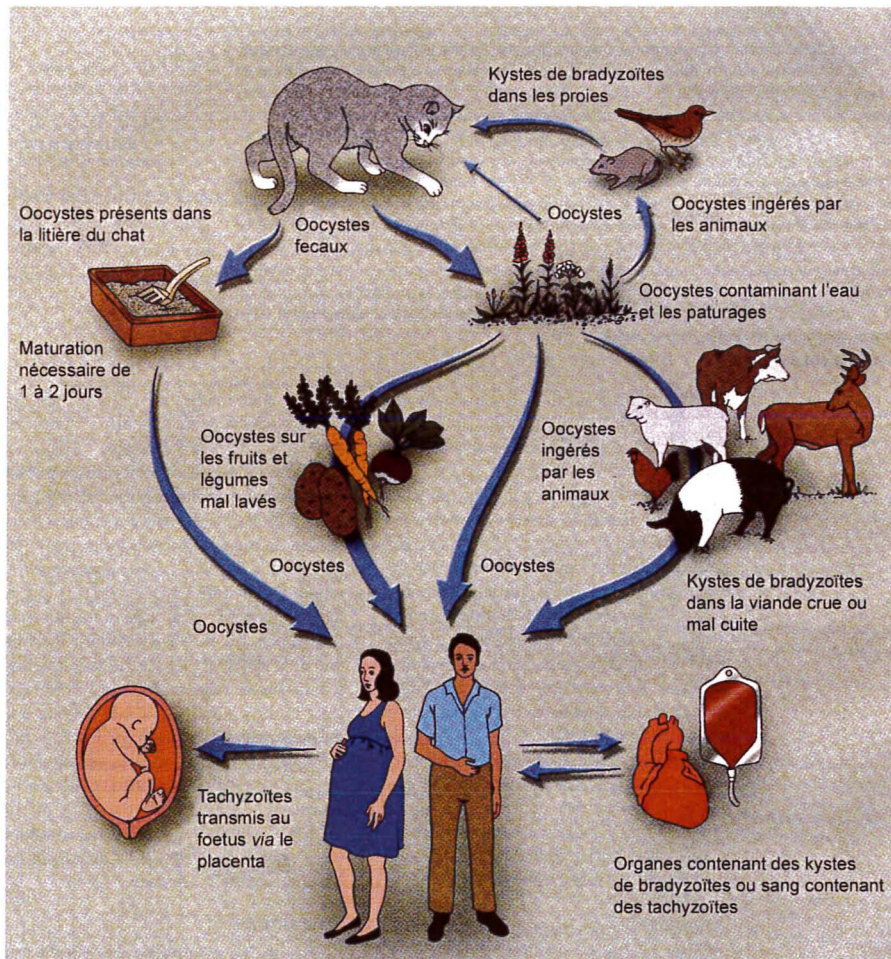


Figure 2 : Cycle parasitaire de *T. gondii* (Lynfield *et al*, 1997)

## 1.5 Modes de contamination et épidémiologie

La contamination de l'homme est essentiellement orale par ingestion de kystes se trouvant dans la viande (principalement mouton) consommée crue ou saignante (Tenter *et al*, 2000). L'homme se contamine également par ingestion d'oocystes présents dans l'environnement (sols et légumes des jardins, tas de sable aménagé pour les jeux des enfants...) ou par contact direct et étroit avec un chat ou sa litière. Plus rarement, les oocystes peuvent être à l'origine de la contamination de l'eau de boisson (Aramini *et al*, 1999).

L'homme peut également se contaminer à la suite d'une greffe d'organe si le greffon contient des kystes de *T. gondii*. Les transplantations cardiaques présentent plus de risque de transmission que les transplantations rénales ou pulmonaires (Hill *et al*, 2002).

L'infection d'une femme enceinte peut entraîner une contamination fœtale lors de la phase aiguë, période pendant laquelle il existe une parasitémie expliquant le passage des tachyzoïtes à travers le placenta. Pendant les premières semaines de la grossesse, le placenta laisse rarement passer les toxoplasmes, le risque de la transmission est donc faible. Au contraire, après le 3<sup>ème</sup> mois, la barrière placentaire est moins efficace et la contamination du fœtus plus fréquente. Ainsi, la transmission du parasite depuis la mère vers le fœtus est estimée en moyenne à 30% mais elle varie de 5% (premier trimestre de la grossesse) à plus de 80% (fin de grossesse) (Dunn *et al*, 1999 ; Pelloux *et al*, 2002).

Dans les situations d'immunodépression (SIDA, greffe de moelle osseuse, chimiothérapie aplasante) les toxoplasmoses sont généralement liées à des réactivations endogènes des propres kystes des patients.

Bien que la répartition de la toxoplasmose soit mondiale, la séroprévalence de cette parasitose varie selon les zones géographiques, les habitudes alimentaires et les niveaux socio-économiques. Ainsi elle est élevée dans les pays chauds et humides et quasiment nulle dans les pays froids et secs. La séroprévalence augmente aussi avec l'âge (Montoya *et al*, 2004).

En France, depuis le début des années 60, une diminution de la séroprévalence est observée ; elle est corrélée au développement des méthodes de conservation et de cuisson des aliments. Aujourd'hui, elle est estimée à 50 % environ (Ambroise-Thomas *et al*, 2001) ; elle reste donc largement supérieure à celle d'autres pays comme la Grande Bretagne, les pays d'Europe du Nord (14 à 25% selon les régions) (Petersson *et al*, 2000) ou bien les Etats-Unis (autour de 22%) (Jones *et al*, 2003). Ces variations peuvent s'expliquer en partie par des habitudes alimentaires différentes selon ces pays.

Le nombre de nouveau-nés atteints de toxoplasmose congénitale en France est estimé à 1 à 2 pour mille naissances soit environ 700 cas par an (Ambroise-Thomas *et al*, 2001) ; cette fœtopathie reste donc un problème de santé publique.



## 1.6 Physiopathologie et immunité anti-toxoplasmique

La phase aiguë de l'infection se traduit par la dissémination des tachyzoïtes par voie hémotogène et lymphatique depuis les entérocytes vers l'ensemble des organes et par le passage des barrières hémato-méningée, hémato-oculaire et placentaire (Barragan *et al*, 2003). Cependant, la réponse immune de l'hôte immunocompétent s'établit rapidement et aboutit au contrôle de la multiplication du parasite, à l'arrêt de sa dissémination et à l'apparition des kystes.

Ainsi, sur le plan humoral, différentes classes d'anticorps apparaissent successivement (immunoglobulines M, A puis G) mais c'est essentiellement l'immunité cellulaire qui joue un rôle prépondérant dans le contrôle de l'infection aiguë. L'IL12 sécrétée par les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles (Denkers *et al*, 2004) active la synthèse et la sécrétion de l'IFN $\gamma$  par les cellules NK dans un premier temps puis par les lymphocytes T (Filisetti *et al*, 2004 ; Lieberman *et al*, 2002). Or, l'IFN $\gamma$  est reconnu pour être la cytokine majeure de l'immunité anti-toxoplasmique en permettant le développement d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire (Suzuki *et al*, 1988).

Malgré ces mécanismes de protection, il n'y a pas d'élimination complète des parasites et ceux-ci évoluent vers une forme quiescente, les bradyzoïtes. Ces derniers vont perdurer tout au long de la vie de l'hôte au sein des kystes ; il s'agit de la phase chronique de l'infection. Un véritable équilibre s'établit entre ces bradyzoïtes intra-kystiques et l'immunité anti-toxoplasmique sans symptomatologie particulière. La rupture des kystes aurait lieu périodiquement mais serait contrôlée par le système immunitaire qui serait donc continuellement stimulé (Lieberman *et al*, 2002).

Mais, dès lors que cet équilibre est rompu, comme lors de l'effondrement des lymphocytes T au cours de l'infection par le VIH, la rupture des kystes peut survenir et entraîner la libération des bradyzoïtes et leur interconversion en tachyzoïtes par des mécanismes qui ne sont pas encore tous élucidés. Il en résulte une reprise de la multiplication parasitaire avec réaction inflammatoire et nécrose hémorragique.

## 1.7 Formes cliniques de la toxoplasmose

### 1.7.1 La toxoplasmose acquise du patient immunocompétent

Elle n'est symptomatique que dans environ 10 % des cas seulement ce qui justifie le dépistage sérologique mensuel de chaque femme enceinte. Les signes sont peu spécifiques à savoir adénopathies cervicales indolores, fièvre, asthénie et sont spontanément résolutifs. La formule sanguine peut révéler une monocytose modérée ainsi que des lymphocytes hyperbasophiles (Montoya *et al*, 2004).

Toutefois, dans de très rares cas, des formes disséminées de toxoplasmose ont été observées chez le sujet immunocompétent avec des atteintes pulmonaires, pleurales, myocardiques ou neurologiques (Bossi *et al*, 2004).

### 1.7.2 La toxoplasmose congénitale

Lors de la phase aiguë d'une primo-infection toxoplasmique survenant chez une femme enceinte, le passage trans-placentaire du parasite est possible et dépend du terme de la grossesse. Mais, en cas de transmission materno-foetale, les lésions cliniques du fœtus sont aussi fonction de sa maturité (et donc de la date de l'infection) et du traitement instauré.

Une atteinte foétale en tout début de grossesse est rare (moins de 5% de transmission materno-foetale) mais gravissime. En effet, une contamination foétale très précoce peut aboutir à la mort in utero, à l'accouchement prématuré ou la naissance à terme d'un enfant présentant un tableau de toxoplasmose polyviscérale nécrotico-hémorragique mortelle (Montoya *et al*, 2004).

Durant la deuxième partie de la grossesse, l'atteinte foétale peut être à l'origine d'une morbidité importante avec macrocéphalie, calcifications intra-crâniennes, atteintes neurologiques (convulsions, comitialité, troubles du tonus, troubles végétatifs) et oculaires (microphthalmie, chorioretinite pigmentaire maculaire). L'évolution de ces formes majeures est sévère : mort dans les premières semaines ou mois de vie ou enfants présentant des retards psychomoteurs considérables.

Une atteinte du fœtus encore plus tardive, au cours du troisième trimestre, peut donner des formes dégradées ou retardées qui seront dépistées à la naissance ou

après plusieurs années (retard psychomoteur, crises convulsives, chorioretinite pigmentaire à tendance récidivante).

Enfin, il existe des formes inapparentes à la naissance et qui ont uniquement une traduction sérologique. Ces formes sont heureusement les plus nombreuses et représentent actuellement 85 % des toxoplasmoses congénitales. En effet, les progrès réalisés au niveau de la prévention des contaminations maternelles et de la prise en charge des séroconversions au cours de la grossesse (biologie, imagerie, traitement) ont permis de diminuer l'incidence des formes sévères et mortelles. Toutefois, le traitement et le suivi des formes inapparentes à la naissance s'avèrent nécessaires afin de prévenir et/ou traiter les réactivations notamment oculaires qui peuvent survenir au cours de l'enfance ou de l'adolescence (Vutova *et al*, 2002 ; Wallon *et al*, 2004).

### 1.7.3 La toxoplasmose du patient immunodéprimé

Elle est tout d'abord décrite chez les patients cancéreux et les sujets atteints de la maladie de Hodgkin (Frenkel *et al*, 1975). Puis, dans les années 1980, en raison de la fréquence croissante des transplantations d'organes, des greffes de moelle osseuse et en raison de l'explosion du sida, les toxoplasmoses survenant chez les patients immunodéprimés sont de plus en plus nombreuses et atteignent ces nouvelles catégories de patients (Luft *et al*, 1983).

Au cours des transplantations d'organes, le patient receveur non immunisé vis à vis de *T. gondii* et recevant une thérapeutique immunosuppressive anti-rejet est exposé à un risque d'infection aiguë du fait des kystes présents au niveau du greffon (cœur, foie). Ces formes sont graves, polyviscérales et peuvent avoir une issue fatale (Botterel *et al*, 2002).

Au cours d'une greffe de moelle osseuse, il existe un risque de réactivation des kystes chez les patients immunisés bénéficiant de chimiothérapies aplasiantes. Ces réinfections endogènes conduisent à des toxoplasmoses disséminées avec de graves lésions cérébrales, cardiaques ou pulmonaires (de Medeiros *et al*, 2001 ; Pagano *et al*, 2004). Le taux de mortalité est estimé entre 60 et 90% (Martino *et al*, 2005). Par contre le risque de primo infection est très faible lors d'une allogreffe de moelle osseuse chez un receveur non immunisé à partir d'un donneur immunisé.

Au cours de l'infection par le VIH, les patients sans immunité antérieure vis à vis de *T. gondii* peuvent présenter une primo-infection symptomatique parfois grave. Pour les patients immunisés, les réactivations toxoplasmiques sont très fréquentes et inaugurent ou compliquent une infection par le VIH. Jusqu'en 1996 et l'avènement des thérapeutiques antirétrovirales hautement actives (HAART), une toxoplasmose cérébrale survenait chez 30

à 60 % des patients atteints de SIDA et *T. gondii* était devenu le pathogène opportuniste le plus fréquemment retrouvé lorsque le taux de lymphocytes CD4 était inférieur à 50/ $\mu$ l (Porter *et al*, 1992). Depuis 1996, l'incidence des encéphalites toxoplasmiques a diminué grâce au traitement antirétroviral et à la prophylaxie systématique par le cotrimoxazole des sujets immunodéprimés (Gray *et al*, 2003). Le tableau clinique de l'encéphalite toxoplasmique associe céphalées, fièvre, confusion et déficits neurologiques focaux et le diagnostic associe la clinique, les signes radiologiques et les données de la biologie moléculaire. D'autres localisations sont de plus en plus décrites : pneumopathie interstitielle, chorioretinite, myocardite...

## 1.8 Diagnostic de la toxoplasmose

La démarche diagnostique est différente selon le type de toxoplasmose suspectée. Un dépistage est réalisé systématiquement chez les femmes enceintes dont on veut connaître le statut sérologique au début d'une grossesse. Dans le cas d'une séroconversion survenant chez une femme enceinte, une contamination fœtale sera recherchée (Pelloux *et al*, 2002). Le diagnostic se pose aussi chez des sujets immunodéprimés présentant des signes cliniques évocateurs de la maladie.

Chez le sujet immunocompétent, le diagnostic repose sur la mise en évidence d'anticorps antitoxoplasmiques. Chez le sujet immunodéprimé ou lors de suspicion de toxoplasmose congénitale, *T. gondii* sera recherché directement dans différents liquides biologiques et l'imagerie médicale apportera une aide précieuse afin de poser un diagnostic.

### 1.8.1 L'exploration du statut sérologique

Actuellement, le sérodiagnostic de toxoplasmose est largement répandu, il repose sur des méthodes sérologiques réalisées dans la plupart des laboratoires de ville et des méthodes plus complexes réservées aux laboratoires hospitaliers ou spécialisés.

Les premiers anticorps synthétisés sont les IgM. Ils sont produits dans la première semaine qui suit la contamination, augmentent dans le mois suivant et persistent durant une période plus ou moins longue. Ils peuvent être détectés par immunofluorescence

indirecte (IFI) (Remington *et al*, 1968), par des méthodes ELISA, ISAGA (Desmonts *et al*, 1981) ou par agglutination directe.

Selon les méthodes utilisées, les IgG ont une cinétique différente. Les IgG de spécificité membranaire apparaissent une à deux semaines après la contamination puis leur taux augmente rapidement et il est maximum au bout de deux mois. Le titre reste élevé pendant plusieurs mois puis diminue lentement. Un taux résiduel est le témoin d'une immunité ancienne. De tels anticorps sont mis en évidence par le Dye Test de Sabin et Feldman qui reste encore aujourd'hui la méthode de référence (Reiter-Owona *et al*, 1999), par IFI ou par agglutination directe.

Lorsque des extraits antigéniques solubles sont utilisés, les IgG correspondants sont détectés moins précocement. Le décalage dans la mise en évidence de ces IgG est de 15 jours à un mois par rapport aux anticorps dirigés contre la membrane. Ce type d'anticorps est détecté par des méthodes ELISA et par des réactions d'hémagglutination.

D'autres techniques plus spécialisées ont leur importance dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale car elles permettent la comparaison du profil immunitaire de l'enfant avec celui de la mère. Il s'agit d'une part du Western Blot, technique mettant en évidence des anticorps néosynthétisés chez le nouveau né (Remington *et al*, 2004 ; Tissot Dupont *et al*, 2003), et d'autre part de l'ELIFA qui permet également d'établir le profil de la réponse immunitaire de la mère et du nouveau-né (Zufferey *et al*, 1999).

### 1.8.2 La mise en évidence du parasite

Dans certaines situations, immunodépression et suspicion de toxoplasmose congénitale en particulier, situations dans lesquelles les explorations sérologiques ne permettent pas d'établir un diagnostic de certitude, il est indispensable de mettre en évidence *T. gondii* dans les liquides biologiques (Montoya *et al*, 2004).

- **Recherche du parasite par examen direct** : il est possible sur différents prélèvements tels que les biopsies, les pièces d'exérèse et les cyto centrifugations des liquides biologiques de mettre en évidence des tachyzoïtes ou des kystes par la coloration de Giemsa ou par immunomarquage par des anticorps monoclonaux (Barcan *et al*, 2002 ; Munir *et al*, 2000). Cependant, cet examen direct est très rarement positif car les toxoplasmes sont généralement présents en faible quantité.

- **Recherche du parasite par culture** : une culture *in vivo* sur souris peut être réalisée par injection péritonéale d'un liquide centrifugé ou d'un tissu traité. Puis, la recherche de *T. gondii* chez la souris se réalise par microscopie sur des extraits de cerveau (recherche des kystes) 6 semaines après l'inoculation. Cette technique est intéressante mais demande un délai pour le rendu du résultat. Elle permet néanmoins d'entretenir les souches de *T. gondii* et reste la méthode de référence. La culture *in vitro* sur un tapis cellulaire (type MRC5) est également possible, elle fournit une réponse plus rapide mais manque de sensibilité (Bastien, 2002).
- **Recherche des acides nucléiques du parasite** : les techniques d'amplification génique (PCR et PCR en temps réel) permettent de mettre en évidence l'ADN toxoplasmique dans différents prélèvements et ceci dans des délais rapides. La PCR réalisée dans le liquide amniotique a amélioré nettement le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (Hohlfeld *et al*, 1994). La PCR permet également la détection de *T. gondii* dans le sang, le tissu cérébral, le LCR ou le LBA apportant ainsi une aide précieuse pour poser le diagnostic de toxoplasmose chez un patient immunodéprimé (Abraham *et al*, 2000 ; Dupouy-Camet *et al*, 1993).

### 1.8.3 L'imagerie médicale

L'échographie obstétricale reste un élément majeur du suivi des grossesses en cas de séroconversion. Elle permet la détection de lésions (dilatations ventriculaires, calcifications, ascite...) et peut être complétée par l'IRM du pôle céphalique fœtal (Pelloux *et al*, 2002). L'IRM et le scanner participent également au diagnostic de toxoplasmose cérébrale (Raffi *et al*, 1997).

### 1.8.4 La conduite du diagnostic de la toxoplasmose congénitale

Il convient dans un premier temps de rechercher et de suivre les femmes enceintes non immunisées vis à vis de *T. gondii* afin d'être en mesure de dépister rapidement une infection au cours de la grossesse. Puis, en cas de séroconversion chez une femme enceinte, un diagnostic anténatal est proposé. Ce diagnostic est discuté pour les séroconversions précoces au cours de la grossesse du fait du faible risque de contamination fœtale. Dans les cas de séroconversions tardives un traitement est parfois instauré sans qu'un diagnostic anténatal soit effectué (Pelloux *et al*, 2002). Enfin, à la naissance de

l'enfant, un suivi biologique est mis en place afin de repérer les toxoplasmoses congénitales qui auraient échappé au diagnostic anténatal.

- **Dépistage sérologique** : il est obligatoire en France depuis 1978 pour toutes les femmes enceintes (Pelloux *et al*, 2002). Ce sérodiagnostic est codifié, il doit permettre de déceler les IgM et doit détecter de façon précoce et quantitative les IgG. Soit la sérologie est négative et la surveillance sérologique s'impose jusqu'au terme de la grossesse ; soit l'examen révèle des IgG stables sur deux prélèvements successifs sans IgM et il permet alors de conclure à une immunité ancienne.
- **Datation de la séroconversion** : il s'agit d'une étape nécessaire pour savoir si l'infection a eu lieu pendant la grossesse et pour déterminer la conduite à tenir pour le suivi de la femme enceinte. De plus, la séroconversion doit être dépistée et datée le plus précocement possible afin de limiter le risque de transmission fœtale grâce à l'instauration d'un traitement par la spiramycine.

L'apparition d'IgM puis d'IgG chez une patiente séronégative le mois précédent permet de dater assez précisément la séroconversion. Cependant, il existe d'autres cas de figure pour lesquels l'interprétation est plus difficile comme la présence simultanée d'IgG et d'IgM sans notion de sérologie antérieure. L'analyse de la cinétique différentielle des IgG et des IgM apporte dans certaines situations une aide considérable en permettant de préciser la date de la séroconversion. La recherche de l'indice d'avidité des IgG obtenu avec un test ELISA associé à une étape de lavage par un agent dissociant est aussi un élément déterminant (Pelloux *et al*, 1998). En effet, elle permet dans certains cas d'exclure l'hypothèse d'une infection récente si l'avidité des anticorps est importante.

L'association de différentes techniques sérologiques est donc indispensable pour dater une séroconversion et mettre en place le suivi de la femme enceinte à qui il sera proposé dans certains cas un diagnostic anténatal pour évaluer le risque du fœtus.

- **Diagnostic anténatal** : lors d'une primo-infection toxoplasmique survenant chez une femme enceinte, il est impératif de diagnostiquer une transmission materno-fœtale afin de mettre en place un traitement pour prévenir les lésions cliniques chez le fœtus. Une publication de Foulon *et al* révèle dans une étude prospective multicentrique qu'il existe une relation entre l'absence de séquelles chez l'enfant pendant la première année de vie et l'administration précoce d'un traitement antiparasitaire à la femme enceinte (spiramycine et pyriméthamine/sulfadiazine) (Foulon *et al*, 1999). D'autres travaux plus anciens suggéraient déjà l'importance du diagnostic anténatal et du traitement précoce

(Couvreur *et al*, 1993 ; Daffos *et al*, 1988 ; Hohlfeld *et al*, 1989). En France, il n'y a pas encore d'attitude consensuelle au sujet de la réalisation de ce diagnostic anténatal. Certains centres le proposent quelle que soit la date de la séroconversion. Au CHU de Grenoble, le diagnostic anténatal sur liquide amniotique est proposé aux femmes enceintes contaminées entre la 6<sup>ème</sup> et la 36<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée. En effet, si la contamination survient plus tôt, le risque de transmission foetale est faible (environ 5%) et si la contamination survient en fin de grossesse, un traitement est directement instauré du fait de l'absence de tératogénicité à ce moment là et du risque élevé de la transmission materno-foetale (Pelloux *et al*, 2002).

Pour établir un diagnostic anténatal, une amniocentèse peut être pratiquée à partir de la 18<sup>ème</sup> semaine de grossesse. En général, elle est effectuée un mois après la date présumée de l'infection. L'utilisation du sang foetal prélevé par cordocentèse à partir de la 21<sup>ème</sup> semaine de grossesse a été abandonnée au fil des années. En effet, il est prouvé que la cordocentèse présente plus de dangers pour le foetus que l'amniocentèse, le risque de mort foetale après cordocentèse étant estimé à 2% environ (Boulot *et al*, 1990).

La détection directe du parasite dans le liquide amniotique peut s'effectuer chez la souris par inoculation péritonéale (Desmots *et al*, 1985) ou par mise en culture *in vitro* du prélèvement (Derouin *et al*, 1988). Cependant, l'inconvénient majeur de l'inoculation à la souris est le délai avant d'obtenir le résultat (4 à 6 semaines). La culture *in vitro* permet un rendu de résultats plus rapide mais est moins sensible que la culture sur souris (Bastien, 2002). De plus, différents auteurs ont conclu à une sensibilité moyenne des ces deux techniques (Hezard *et al*, 1997 ; Vidigal *et al*, 2002). Par contre, la spécificité de ces méthodes est excellente, elle est estimée très souvent autour de 100%.

Depuis le début des années 90, de nombreuses méthodes de détection de *T. gondii* par PCR ont été développées (Pelloux *et al*, 1998). Le gène le plus couramment amplifié est le gène B1, répété 35 fois dans le génome du parasite et retrouvé dans toutes les souches de *T. gondii* (Burg *et al*, 1989). Une autre cible possible est le gène codant pour la protéine de surface P30 (Savva *et al*, 1990), mais comme ce gène ne possède qu'une seule copie dans le génome, il est moins intéressant. Le gène répété 110 fois et codant pour la partie 18S de l'ARN ribosomal est également utilisé par certaines équipes (Cazenave *et al*, 1992). Beaucoup plus récemment, la découverte d'un gène de 529 bases répété 200 à 300 fois permet d'envisager d'améliorer encore la sensibilité de la PCR (Filisetti *et al*, 2003 ; Homan *et al*, 2000).

Dans le cadre du diagnostic prénatal, la PCR sur le liquide amniotique est très largement utilisée car elle combine rapidité, sensibilité et spécificité. Les études montrent une meilleure sensibilité de la PCR par rapport aux méthodes classiques (Hohlfeld *et al*,



1994 ; Robert *et al*, 1996 ; Romand *et al*, 2001 ; Vidigal *et al*, 2002) et il arrive que la PCR soit l'unique argument diagnostique. La spécificité de la PCR sur liquide amniotique, quant à elle, est excellente et avoisine 100%. En effet, si les conditions permettant d'éviter les contaminations sont bien respectées, il est extrêmement rare d'obtenir des faux positifs.

Les nombreux avantages de la PCR en temps réel dont la possibilité de quantifier la charge parasitaire expliquent aujourd'hui son développement et son application dans le cadre du diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale (Bretagne, 2003).

Parallèlement à ce diagnostic anténatal par PCR, un suivi échographique mensuel est instauré afin de dépister précocement le développement d'éventuelles anomalies fœtales (dilatations ventriculaires, zones échogènes intracrâniennes, épaissement placentaire, splénomégalie). En cas de difficultés d'interprétation de la morphologie fœtale, un recours à l'IRM peut avoir lieu.

En cas de diagnostic anténatal positif, la poursuite de la grossesse est discutée en fonction des données du suivi échographique et de la date présumée de l'infection. Si des anomalies échographiques sont présentes, bien que des évolutions favorables sous traitement aient été rapportées (Friedman *et al*, 1999), une interruption médicale de grossesse est proposée.

- **Bilan néonatal** : il convient d'effectuer à la naissance un bilan néonatal afin de repérer les toxoplasmoses congénitales ayant échappées au dépistage anténatal. Là encore, un diagnostic précoce permettant l'instauration d'un traitement précoce est fondamental pour diminuer le taux de séquelles à long terme. Ce diagnostic biologique néonatal repose sur deux stratégies : la mise en évidence du parasite dans le placenta (Fricker-Hidalgo *et al*, 1998) et la recherche chez l'enfant d'anticorps néosynthétisés susceptibles de traduire une atteinte congénitale (Robert-Gangneux *et al*, 1999).

## 1.9 Traitement et prévention

Un traitement n'est pas nécessaire chez un patient immunocompétent. Chez la femme enceinte, la spiramycine (Rovamycine®) est administrée dès la séroconversion pour prévenir le passage transplacentaire puis maintenue jusqu'à l'accouchement. La moindre suspicion d'atteinte fœtale (diagnostic anténatal positif) doit imposer un traitement par des

molécules pouvant passer à des concentrations suffisantes chez le fœtus. L'association sulfadoxine/pyriméthamine (Fansidar®) ou sulfadiazine/pyriméthamine (Adiazine® et Malocide®) est alors instaurée. Selon les équipes, la spiramycine est maintenue ou arrêtée. Si la séroconversion a lieu après la 36<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée, certains préconisent de traiter directement par Fansidar® ou sulfadiazine/pyriméthamine (Pelloux *et al*, 2002).

Le traitement de l'enfant infecté est instauré dès la naissance si un diagnostic anténatal a été posé. Il associe là aussi pyriméthamine et sulfamides au moins pendant un an. En cas de diagnostic anténatal négatif, s'il y a après la naissance des arguments biologiques en faveur d'une toxoplasmose congénitale, un traitement par Fansidar® est mis en place et sera également réévalué au bout d'un an (Pelloux *et al*, 2002).

La toxoplasmose du patient immunodéprimé est traitée par l'association pyriméthamine/sulfadiazine pendant 6 semaines ; en cas d'intolérance aux sulfamides, la clindamycine peut être utilisée. L'association triméthoprime/sulfaméthoxazole à dose élevée (Bactrim®) est également très efficace comme traitement d'attaque (Lacombe *et al*, 2004 ; Torre *et al*, 1998).

La prévention de la toxoplasmose congénitale repose d'abord sur la prévention de l'infection maternelle. Pour cela, des recommandations hygiénodietétiques sont données personnellement à chaque femme enceinte non immunisée en tout début de grossesse. Puis la surveillance mensuelle des femmes enceintes séronégatives permet de repérer une éventuelle infection et de la traiter précocement.

Tous les patients immunodéprimés doivent bénéficier d'une sérologie. Si celle-ci est négative, des conseils d'hygiène alimentaire peuvent être alors dispensés. Pour les patients immunisés, une chimioprophylaxie primaire est instaurée. Ainsi, pour les patients séropositifs pour le VIH dont le taux de CD4 est inférieur à 200/ $\mu$ l, un traitement prophylactique primaire par le Bactrim® est recommandé. Une prophylaxie secondaire, après guérison clinique et radiologique doit être maintenue à vie en raison du risque important de rechute. Cette prophylaxie consiste en la prescription de la moitié voire du tiers de la dose du traitement curatif (Lacombe *et al*, 2004).

## 2. La PCR en temps réel

### 2.1 Principes de la PCR en temps réel

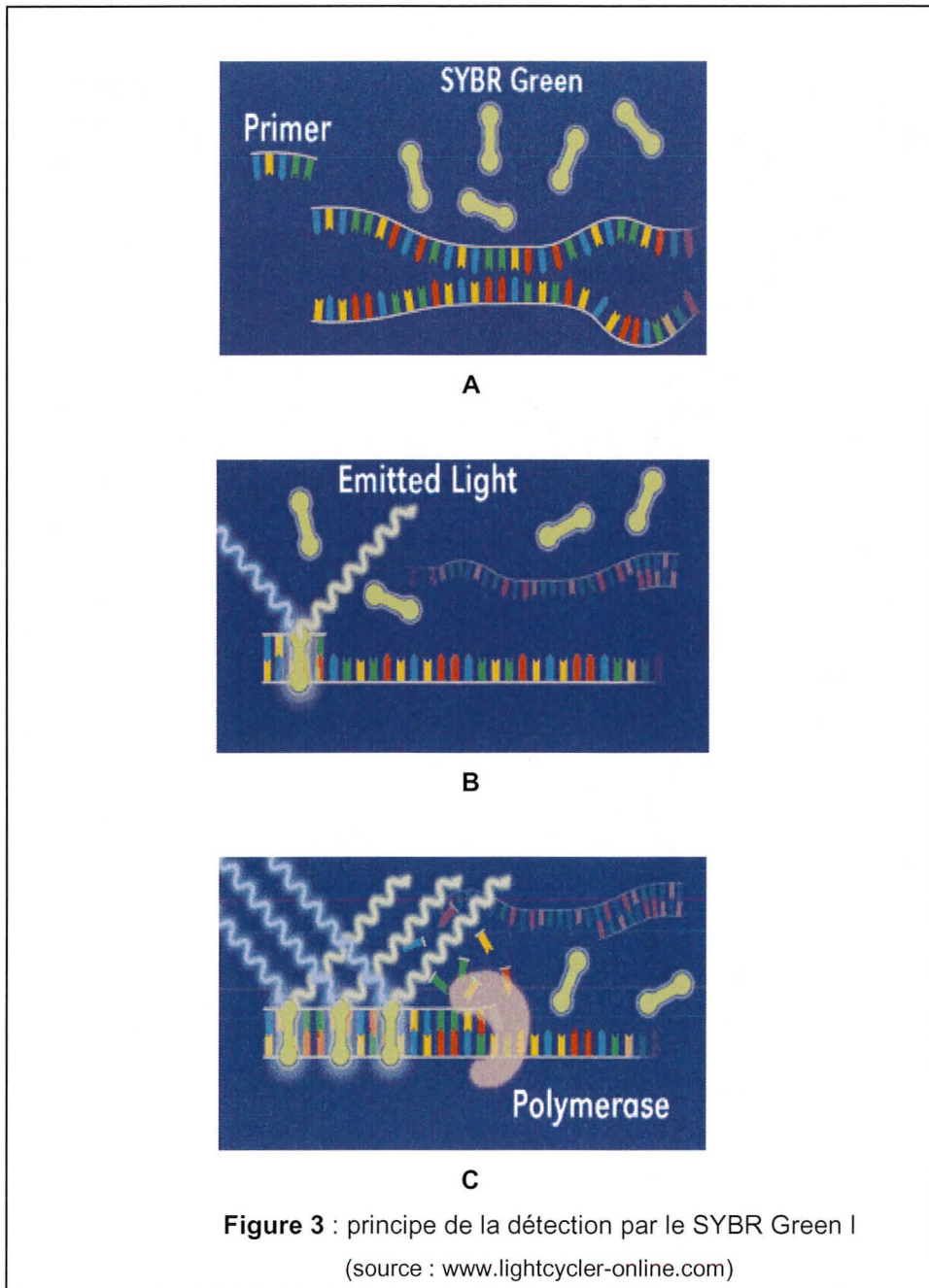
L'introduction d'une molécule fluorescente dans le milieu réactionnel et la détection des amplifications cycle par cycle par une méthode fluorimétrique sont les bases des techniques de PCR en temps réel (RT-PCR). Cette nouvelle technologie repose donc sur une analyse de la cinétique de la réaction d'amplification alors que la PCR classique s'appuie sur une détection en point final des produits formés (Tse *et al*, 2003).

Les systèmes de détection font appel soit à un agent intercalant se fixant directement sur l'ADN double brin, soit à des sondes fluorogéniques s'hybridant de manière spécifique sur le fragment cible à amplifier.

#### 2.1.1 Détection par un agent intercalant, le SYBR Green I

A chaque cycle de RT-PCR, le SYBR Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin nouvellement synthétisé (figure 3B) et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets (figure 3C). La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR.

Ce système est simple, très sensible mais de spécificité essentiellement conditionnée par le choix des amorces. En effet, le SYBR Green I se fixe sur toutes les molécules d'ADN double brin nouvellement synthétisées qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt. Ainsi, tous les produits de PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorces éventuellement formés vont engendrer un signal de fluorescence. Cet inconvénient constitue la limite majeure des systèmes de détection utilisant un agent intercalant.



Néanmoins, la réalisation à la fin de la réaction PCR d'une courbe de fusion et la détermination des températures de fusion ( $T_m$ ) permettent de savoir si des séquences non spécifiques ont été amplifiées. En effet, chaque produit d'amplification est caractérisé par sa température de fusion, température à laquelle la moitié des amplicons est sous la forme d'ADN simple brin. A la fin de l'amplification, le mélange réactionnel est donc soumis à un cycle d'élévation très progressive de la température et la fluorescence est enregistrée en continu. Lorsque la température de fusion est atteinte, une chute brutale du signal de fluorescence est observée. Lors de l'analyse de la courbe de fusion qui représente l'intensité

de la fluorescence en fonction de la température, il est donc possible de mettre en évidence la présence d'éventuelles amplifications non spécifiques (Ririe *et al*, 1997). Cette étape est fondamentale et rapide et il n'est alors plus nécessaire de recourir à une étape post PCR de migration sur gel pour analyser les produits amplifiés.

### 2.1.2 Détection par des sondes

La détection des amplifications par des sondes repose sur le principe de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer). Ce transfert d'énergie se réalise entre une molécule excitée, le fluorophore donneur, et une molécule voisine, le fluorophore accepteur ou « quencher ». L'énergie transférée est absorbée par le « quencher » qui pour revenir à son état stable initial restitue à son tour cette énergie sous la forme d'une émission de fluorescence ou sous la forme de chaleur (Tse *et al*, 2003).

Deux conditions sont à respecter pour obtenir un transfert d'énergie entre deux fluorophores : le chevauchement du spectre d'émission de l'un avec le spectre d'absorption de l'autre et une distance optimale entre les deux sondes.

Plusieurs stratégies de détection existent qui se différencient par la nature du « quencher » participant au transfert d'énergie (Glazer *et al*, 1997).

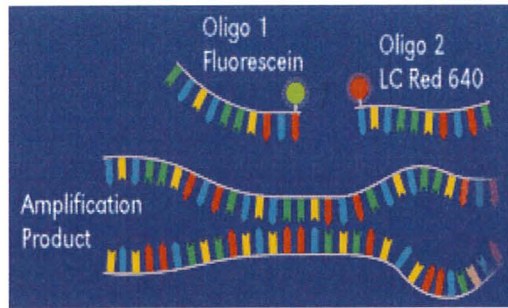
- **Les sondes FRET en tandem** : ce système utilise deux sondes nucléotidiques d'hybridation très courtes portant chacune un fluorophore (figure 4A). Ces deux sondes sont complémentaires d'une partie du gène cible et s'hybrident donc spécifiquement sur le fragment d'ADN à amplifier. Une fois hybridées, elles sont séparées par moins de 5 nucléotides. Le transfert d'énergie est alors direct et hautement efficace : l'énergie libérée par le fluorophore donneur (après excitation de celui-ci par un rayonnement) est directement capté par le fluorophore. Le fluorophore accepteur ainsi excité émet à son tour un signal fluorescent afin de revenir à un état stable (figure 4B). La mesure de ce signal doit s'effectuer pendant la phase d'hybridation de la PCR, phase pendant laquelle les deux sondes sont appariées au fragment cible à amplifier.

Dans le cas où le fragment d'intérêt n'est pas présent, les sondes ne s'apparient pas et restent éloignées les unes des autres. Le transfert d'énergie ne se réalise pas et il n'y a aucun signal détectable (figure 4C).

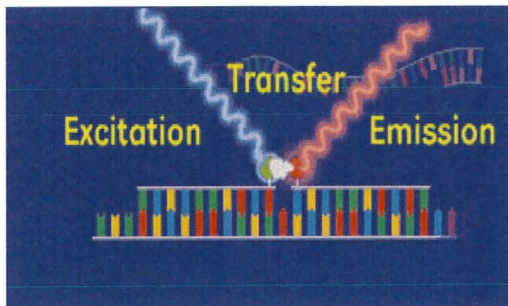
Ce système permet donc d'augmenter la spécificité de la PCR puisque le signal mesuré est lié à l'hybridation des sondes sur une cible qui leur est spécifique (Wittwer *et al*, 1997). Le phénomène de FRET n'est efficace que lorsque la fluorescéine est associée à

l'un des fluorophores très particuliers qui sont les rouges LightCycler® : LC Red 640 et LC Red 705.

- **La sonde d'hydrolyse ou sonde Taqman® (Livak et al, 1995)** : une sonde d'hydrolyse est un fragment d'oligonucléotides complémentaire d'une partie du fragment cible à amplifier. Cette sonde possède deux fluorophores à ses extrémités. L'extrémité 5' est associée à un dérivé de la fluorescéine tandis que l'extrémité 3' porte une molécule « quencher » qui restitue l'énergie transmise sous forme de chaleur. Le système Taqman® se sert de l'activité 5'-3' nucléase de la Taq polymérase afin d'hydrolyser la sonde hybridée à sa séquence complémentaire. Ce clivage éloigne ainsi les deux fluorophores entraînant alors l'interruption du phénomène de quenching ; la fluorescence de la fluorescéine est ainsi mesurable en fin de chaque cycle d'amplification. Ce système impose donc une condition supplémentaire : la température d'hybridation de la sonde doit être identique à la température d'élongation de la PCR (figure 5).
- **La sonde Beacon® (Tyagi et al, 1996)** : il s'agit d'une sonde en épingle à cheveux s'hybridant sur le fragment à amplifier. Une molécule fluorescente se trouve à l'extrémité 5' de cette sonde et un « quencher » positionné en 3' absorbe l'énergie de fluorescence et la restitue sous forme de chaleur lorsque la sonde n'est pas hybridée et reste sous sa forme de boucle. Par contre, une fois hybridée à sa séquence cible, la sonde subit un changement de conformation éloignant le quencher de la molécule fluorescente ; la fluorescence est alors mesurable à ce moment là. Ce système est le plus spécifique car la formation d'une structure repliée en épingle à cheveux est thermodynamiquement favorisée et le changement de conformation ne s'effectue qu'en présence de la séquence complémentaire. Ainsi, en cas de mésappariement touchant un seul nucléotide, la sonde ne s'hybride pas. D'un autre côté, cela entraîne un inconvénient majeur : la difficulté de conception d'une telle sonde (figure 6).



A

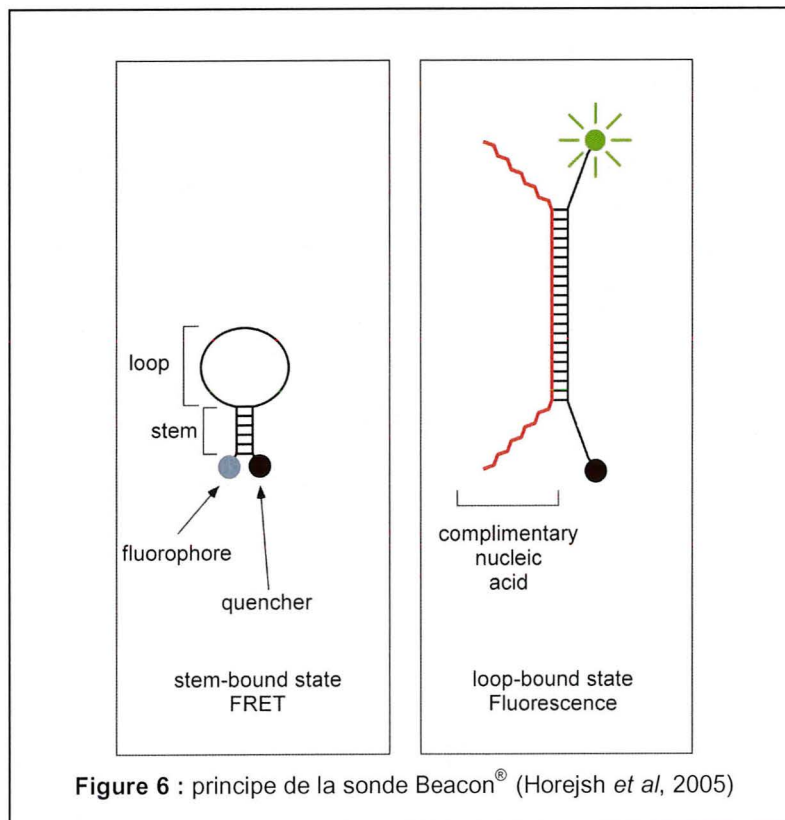
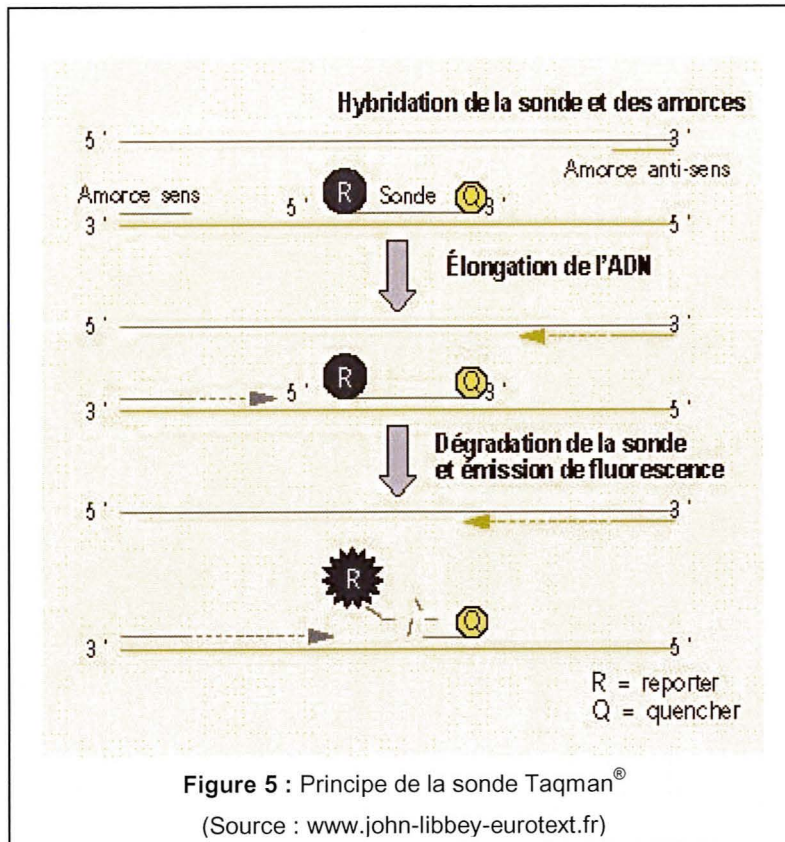


B



C

**Figure 4** : principe des sondes FRET en tandem  
 (Source : [www.lightcycler-online.com](http://www.lightcycler-online.com))





## 2.2 Principe de la quantification

Le principe de la PCR en temps réel repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification via la fluorescence émise soit par le SYBR Green I, soit par les sondes fluorogéniques. Comme l'augmentation de la quantité d'ADN formé à chaque cycle entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence mesurée par le système de détection, il est possible d'obtenir une courbe représentant l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Cette courbe permet de caractériser les différentes phases de la cinétique de PCR : la phase d'initiation de la réaction, la phase exponentielle et la phase de plateau (figure 7).

Le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelé cycle seuil optique. Le cycle seuil optique se définit par le nombre de cycles réalisés pour que l'intensité de la fluorescence émise dépasse une valeur seuil significativement différente du bruit de fond. Il est symbolisé par les lettres Ct (threshold cycle) ou Cp (crossing point). Ce cycle seuil est un point remarquable car il se trouve inversement proportionnel au logarithme du nombre de molécules d'ADN cible initialement présentes avant le début de l'amplification (Heid *et al*, 1996).

Afin de déterminer la quantité d'ADN présente dans un échantillon biologique, il faut établir une gamme d'étalonnage à partir de plusieurs dilutions sérielles d'un standard externe homologue titré en nombre de copies de gènes. Pour chacune des dilutions effectuées, la cinétique de la réaction PCR est suivie en temps réel afin de déterminer le cycle seuil optique correspondant. La droite d'étalonnage exprimant les variations du cycle seuil en fonction de la quantité d'ADN contenue dans chaque point de gamme est par la suite tracée. Après validation de cette droite par l'efficacité d'amplification et le coefficient de régression linéaire, il est possible dans un deuxième temps de déterminer dans des échantillons biologiques la quantité d'ADN présent par extrapolation du cycle seuil (figure 8).

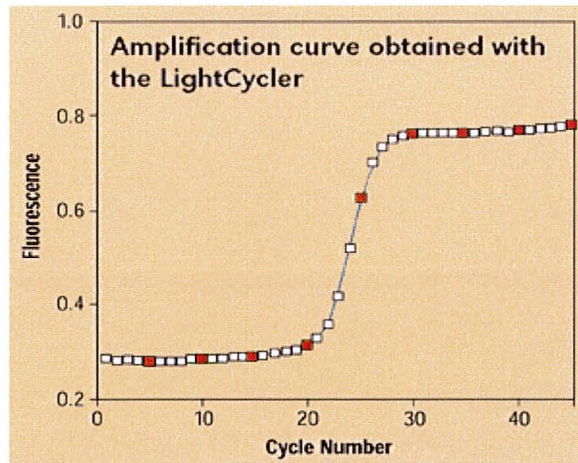


Figure 7 : Courbe de suivi en temps réel d'une réaction PCR  
(source : [www.lightcycler-online.com](http://www.lightcycler-online.com))

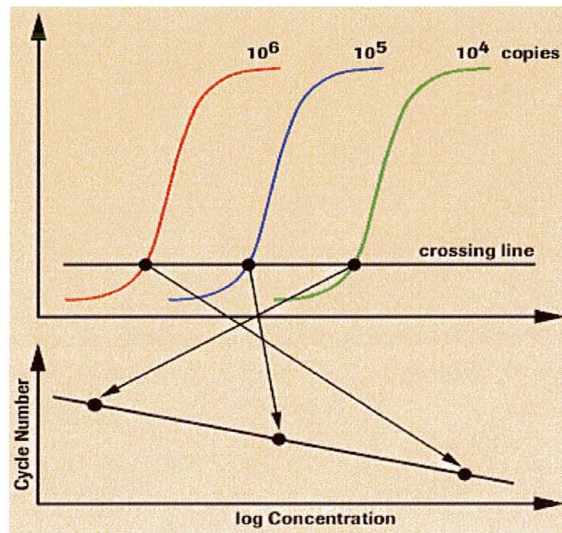


Figure 8 : principe de la quantification  
(source : [www.lightcycler-online.com](http://www.lightcycler-online.com))

## 2.3 Appareils de détection

Une instrumentation performante accompagne les nouvelles approches de PCR en temps réel. Tous les appareils combinent un thermocycleur et un module de détection de la fluorescence, le tout étant piloté par une station de travail informatique qui permet l'acquisition des données en temps réel et leur traitement.

Plusieurs appareils sont actuellement commercialisés et peuvent être classés en deux catégories (Tse *et al*, 2003). Tout d'abord les systèmes haut débit qui permettent le suivi simultané d'au moins 96 réactions PCR : ABI Prism 5700®, 7500®, 7700® et 7900® (Applied Biosystems), iCycler® (Biorad), Opticon II® (GMI). D'autres appareils sont à moindre débit mais de plus grande flexibilité : LightCycler® (Roche Diagnostics), Cobas Taqman 48® (Roche Diagnostics), Rotor-Gene (MBI-Fermentas).

Il serait fastidieux de présenter un par un tous ces appareils qui reposent sur les mêmes principes. La description du LightCycler®, utilisé pour notre travail, donne une idée du mode de fonctionnement de ces systèmes.

Le LightCycler® comprend tout d'abord un thermocycleur à air pulsé qui permet d'obtenir des vitesses de montée et de descente en température de l'ordre de 20°C par seconde. Les cycles sont donc très rapides (environ 10 secondes) ce qui raccourcit beaucoup la durée de l'amplification par rapport à une PCR classique. Les amplifications se déroulent à l'intérieur de capillaires en verre supportant ces variations rapides de température (Wittwer *et al*, 1997).

Un microspectrofluorimètre est intégré ; il permet grâce à une lampe électronique LED (Light Emitting Diode) l'excitation des molécules fluorescentes ainsi que la détection des signaux de fluorescence émis par le SYBR Green I ou par une sonde fluorogénique grâce à des photodiodes. Le LightCycler® possède trois photodiodes avec des filtres optiques différents (530, 640 et 705 nm), il est donc capable de détecter en simultané des signaux de fluorescence émis par plusieurs fluorophores.

Enfin, une station de travail informatique permet d'acquérir en temps réel les données mesurées et de les afficher. De plus, ce logiciel est capable d'effectuer, toujours en temps réel, l'analyse différentielle des signaux de chaque fluorophore présent dans le milieu réactionnel (analyse dite « multiplexe »). Il ne reste plus qu'à l'utilisateur de choisir un canal de lecture pour suivre la cinétique de PCR se rapportant à un fluorophore particulier. Cette station informatique permet enfin l'analyse des données brutes de fluorescence afin de rendre un résultat final en fonction de l'application choisie : quantification, courbe de fusion, etc.

## 2.4 Intérêts et applications de la PCR en temps réel

D'une façon générale, la PCR en temps réel a simplifié l'amplification des acides nucléiques. Cette technique est tout d'abord très rapide, elle permet d'obtenir des résultats en quelques heures alors que la PCR classique est plus longue. Il s'agit également d'une technique très spécifique grâce à la complémentarité des sondes à leur séquence cible. De plus, elle ne nécessite pas d'étape post-PCR pour la détection des amplifications ce qui réduit considérablement les contaminations et les faux-positifs et entraîne un gain de temps.

D'après les premières études, la sensibilité des PCR en temps réel est au moins égale à celle de la PCR classique quand le système de détection est effectué avec des sondes fluorogéniques (Drago *et al*, 2004 ; Mary *et al*, 2004 ; Stevens *et al*, 2002). En effet, l'utilisation d'un simple agent intercalant réduit parfois la sensibilité des méthodes (Teo *et al*, 2002). Mais la PCR en temps réel apporte surtout une réponse quantitative et ouvre des perspectives dans de nombreux domaines (Bell *et al*, 2002 ; Klein, 2002).

Pour terminer, une meilleure standardisation entre les différents laboratoires par rapport à la PCR classique peut être espérée grâce aux trousse de quantification utilisant des standards internationaux de l'OMS. Ces trousse existent pour l'instant principalement dans le domaine de la virologie médicale (Niesters, 2004).

Ainsi, la PCR en temps réel est devenue au cours de ces dernières années un outil très intéressant et prometteur dans de nombreuses disciplines.

Certaines pathologies bactériennes, virales ou parasitaires sont aujourd'hui diagnostiquées par PCR en temps réel et de nombreuses publications suggèrent l'importance de cette technique en microbiologie clinique (Bell *et al*, 2002 ; Bu *et al*, 2005 ; Klein, 2002 ; Lachnik *et al*, 2002 ; Plantier *et al*, 2004).

La PCR en temps réel connaît également des applications multiples en oncologie (Bernard *et al*, 2002) et dans le domaine de l'expression génique : analyse de promoteurs, analyse des mutations, étude des ARNm variants (Vandenbroucke *et al*, 2001).

La PCR en temps réel est donc une technique rapide, sensible, spécifique, automatisable qui diminue le risque de contamination existant pour une PCR classique. Elle représente un réel progrès dans de nombreux domaines et, en particulier, elle connaît une importance croissante dans le diagnostic de la toxoplasmose.

# 3. Application de la PCR en temps réel au diagnostic de la toxoplasmose

## 3.1 Protocoles décrits dans la littérature

Il existe actuellement dans la littérature 8 protocoles de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *T. gondii* ; ces protocoles sont résumés dans le tableau I (Buchbinder *et al*, 2003 ; Costa *et al*, 2000 ; Jauregui *et al*, 2001 ; Kupferschmidt *et al*, 2001 ; Lin *et al*, 2000 ; Reischl *et al*, 2003 ; Romand *et al*, 2004). Par la suite, certains de ces protocoles ont été modifiés par d'autres équipes (par exemple, introduction d'un contrôle interne dans le protocole de Reischl par Hierl *et al*).

Le gène B1 est amplifié dans quatre de ces protocoles (par quatre couples d'amorces différents) ; le gène codant pour la protéine P30 et le gène de 529 bases répété 200 à 300 fois sont utilisés chacun dans un protocole tandis que deux études amplifient le gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal (deux couples d'amorces différents).

Initialement deux protocoles seulement incluent un contrôle interne (Costa *et al*, 2000 ; Jauregui *et al*, 2001). Il s'agit dans ces deux cas d'un gène de souris, c'est à dire un contrôle interne externe. Par la suite, Hierl *et al* ont modifié le protocole de Reischl en incluant un contrôle interne (gène de la  $\beta$  actine) et Menotti *et al* ont repris le protocole de Costa et ils ont introduit un nouveau contrôle interne (gène de la  $\beta$  globine humaine).

Ces techniques permettent la quantification de la charge parasitaire pour une gamme de concentration étendue. Les droites d'étalonnage sont réalisées dans la plupart des cas à partir d'une série de dilutions d'ADN. Les milieux utilisés pour réaliser les dilutions ne sont jamais précisés sauf dans l'étude de Kupferschmidt *et al* qui obtiennent une droite d'étalonnage à partir de dilutions de toxoplasmes dans du sang, du LCR ou du liquide amniotique (Kupferschmidt *et al*, 2001).

La limite de quantification est en général autour d'un équivalent de génome parasitaire par prise d'essai, parfois elle est encore plus basse : 0,25 équivalent génome/prise d'essai (Reischl *et al*, 2003) ; 0,75 équivalent génome/prise d'essai (Costa *et al*, 2000) ; 0,05 équivalent génome/prise d'essai (Lin *et al*, 2000). Malheureusement, du fait

de la manière dont les gammes d'étalonnage sont préparées, cette limite de quantification est toujours rapportée au volume de la prise d'essai de la PCR et non pas au volume d'échantillon biologique. Seule l'étude de Kupferschmidt présente une telle limite de quantification : 10 toxoplasmes/ml de sang, de LCR ou de liquide amniotique. Les véritables limites de quantification restent donc à préciser.

Les PCR en temps réel décrites sont spécifiques, reproductibles et donnent des résultats concordants avec ceux trouvés par des PCR classiques (Costa *et al*, 2001 ; Kupferschmidt *et al*, 2001 ; Reischl *et al*, 2003)

Six autres études sont également publiées mais elles utilisent les protocoles précédemment décrits. Hierl *et al* reprennent le protocole décrit par Reischl et incluent un contrôle interne (Hierl *et al*, 2004). Plusieurs équipes utilisent le protocole de Costa *et al* et l'appliquent au diagnostic de la toxoplasmose du patient immunodéprimé (Botterel *et al*, 2002 ; Menotti *et al*, 2003), au diagnostic de la toxoplasmose oculaire (Simon *et al*, 2004) ou au diagnostic de la toxoplasmose congénitale (Flori *et al*, 2003 ; Ordinaire *et al*, 2005).

Auteurs	Gène amplifié	Contrôle interne	Technique de détection/appareil	Technique d'extraction	Etablissement de la gamme	Quantification	Echantillons biologiques analysés
Reischl et al	Gène de 529 bases	Non	Sondes FRET en tandem/LightCycler	High Pure Template Preparation kit (Roche)	Dilution de l'ADN	0,25 à 2,5.10 <sup>4</sup> toxoplasmes/5µl	Liquides amniotiques
Hierl et al		Oui (gène de la β actine)					Sang, LBA, LCR
Buchbinder et al	Gène B1 (amorces de Burg et al)	Non	Sondes FRET en tandem/LightCycler	QIAamp DNA mini kit (Qiagen)	Dilution de l'ADN	10 à 10 <sup>5</sup> toxoplasmes/2µl	Sérum
Buchbinder et al	Gène de la protéine P30	Non	Sondes FRET en tandem/LightCycler	QIAamp DNA mini kit (Qiagen)	Dilution de l'ADN	10 à 10 <sup>5</sup> toxoplasmes/2µl	Sérum
Costa et al	Gène B1	Oui (gène de souris)	Sondes FRET en tandem/LightCycler	Méthode classique	Dilution de l'ADN	0,75 à 7,5.10 <sup>5</sup> toxoplasmes/10µl	Sérum et liquides amniotiques
Simon et al		Oui (β globine humaine)		QIAamp DNA mini kit (Qiagen)		0,5 à 5.10 <sup>3</sup> toxoplasmes/µl	Humeur aqueuse
Kupferschmidt et al	Gène codant pour la sous unité 18S de l'ARNr	Non	Sonde Taqman/ABI Prism 7700	QIAamp blood mini kit (Qiagen)	Dilution des toxoplasmes dans sang, LCR et liquide amniotique	10 à 10000/ml	Sang
Jauregui et al	Gène codant pour la sous unité 18S de l'ARNr (amorces ITS1)	Oui (gène de souris)	Sonde Taqman/ABI Prism 7700	Méthode classique	Dilution de l'ADN	1 à 10 <sup>5</sup> toxoplasmes/25µl	Tissus porc et souris
Lin et al	Gène B1 (amorces ToxoR/ToxoF)	Non	Sonde Taqman/ABI Prism 5700	Méthode rapide	Dilution de l'ADN	0,05 à 5000 toxoplasmes/10µl	Coupes de tissus foetaux
Romand et al	Gène B1 (amorces B22/B23)	Non	SYBR Green I LightCycler	QIAamp DNA mini kit (Qiagen)	Dilution d'un plasmide dans du liquide amniotique	?	Liquides amniotiques

**Tableau I :** Protocoles de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *T. gondii*

## 3.2 Application de la PCR en temps réel au diagnostic de la toxoplasmose congénitale

Actuellement les études publiées sont essentiellement techniques et seulement un nombre restreint d'entre elles analysent la corrélation entre la charge parasitaire dans le liquide amniotique et la gravité des lésions fœtales ; ainsi l'intérêt de la quantification est en cours d'investigation mais il est intéressant de décrire les travaux déjà effectués.

Costa et al (Costa *et al*, 2001) ont réalisé une première étude sur 100 liquides amniotiques. Ils ont comparé les résultats obtenus par PCR en temps réel à ceux obtenus par PCR classique : il y a une concordance parfaite entre ces deux techniques.

Puis, ils ont quantifié rétrospectivement la charge parasitaire sur 87 autres liquides amniotiques rendus positifs par PCR classique entre 1995 et 1997. Comme les infections survenant lors du premier trimestre de grossesse sont plus sévères pour le fœtus que celles ayant lieu en fin de grossesse, ils ont émis l'hypothèse d'une concentration parasitaire dans le liquide amniotique plus importante si l'infection survient tôt. Mais, ils n'ont pas trouvé de corrélation entre la charge parasitaire et le nombre de semaines de grossesse au moment de l'infection ( $r = -0,18$ ).

Cependant, parmi les 6 cas où l'échographie a montré des signes de souffrance fœtale (dilatation des ventricules, calcification cérébrale ou ascite), 4 sont associés à une charge parasitaire dans le liquide amniotique supérieure à 1000 parasites/ml.

Une autre équipe (Romand *et al*, 2004) a travaillé rétrospectivement sur 86 liquides amniotiques (rendus positifs par PCR classique). La charge parasitaire dans ces 86 prélèvements a été recherchée et Romand et al ont mis en évidence une corrélation entre la concentration du parasite dans le liquide amniotique et le nombre de semaines de grossesse au moment de l'infection. Mais il semblerait que ce résultat soit discutable ( $r^2=0,069$ ). Par contre, les charges parasitaires seraient statistiquement plus importantes dans les cas de toxoplasmoses symptomatiques.

Puis, par une analyse multivariée, cette équipe montre que les deux paramètres significativement associés à une toxoplasmose congénitale sévère sont une infection maternelle survenant tôt dans la grossesse et une charge parasitaire dans le liquide



amniotique supérieure à 100 toxoplasmes/ml. L'association de ces deux paramètres a une valeur prédictive de séquelles graves de 100%.

De plus, ce travail a inclus l'étude de deux grossesses gémellaires. Dans un de ces cas, la grossesse a été interrompue car les PCR effectuées sur les liquides amniotiques étaient positives. Les charges parasitaires ont été alors recherchées ; la charge parasitaire du liquide amniotique du premier fœtus (dont l'examen anatomopathologique ne révèle pas de signe d'infection) est en dessous du seuil de quantification tandis que la charge parasitaire du liquide amniotique du deuxième fœtus (dont l'examen révèle une infection grave polyviscérale) est estimée à 600 parasites/ml. Pour la deuxième grossesse gémellaire, il y a eu une mort fœtale *in utero* (charge parasitaire dans le liquide amniotique supérieure à 2800 parasites/ml) et la naissance d'un enfant asymptomatique (charge évaluée à 3,2 parasites/ml de liquide amniotique). L'étude de ces deux grossesses gémellaires laisse penser que la gravité des lésions fœtales est corrélée à la charge parasitaire dans le liquide amniotique.

D'après ces deux premières études, il y aurait donc un intérêt à déterminer la charge parasitaire dans le liquide amniotique afin de préciser le pronostic et de discuter de l'interruption de la grossesse. Une troisième étude publiée très récemment offre un autre point de vue.

Ordinaire et al (Ordinaire *et al*, 2005) ont travaillé sur 29 couples mère/enfant (séroconversion de la mère durant la grossesse). Le suivi postnatal des enfants établit que douze d'entre eux sont atteints de toxoplasmose congénitale. Au total, huit liquides amniotiques ont été rendus positifs par PCR conventionnelle et sont analysés par PCR en temps réel afin de quantifier la charge parasitaire.

Le liquide amniotique présentant la charge parasitaire la plus élevée (7508 parasites/ml) est associé à une toxoplasmose asymptomatique tandis que des charges plus faibles sont retrouvées dans des situations de chorioretinite (34 et 269 parasites/ml). Les auteurs concluent à une absence de corrélation entre la quantité de toxoplasmes dans le liquide amniotique et la gravité des atteintes fœtales. Toutefois, cette étude, contrairement à celles décrites auparavant, a été réalisée sur un nombre restreint de liquides amniotiques. Au total, une quantification de la charge parasitaire ne s'est faite que sur huit liquides amniotiques ce qui impose une grande prudence avant d'en tirer des conclusions.

D'autres études prospectives portant sur un nombre important de séroconversions au cours de la grossesse sont bien sûr nécessaires afin d'évaluer l'intérêt de la PCR quantitative dans le pronostic de la toxoplasmose congénitale ; mais cette technique, du fait

de sa sensibilité, de sa simplicité relative de mise en œuvre (amplification et détection en une seule étape), du gain de temps qu'elle permet (quelques heures au lieu de un à deux jours) pourrait remplacer dans le futur les PCR classiques. Toutefois, sa mise en pratique reste réservée aux laboratoires spécialisés qui ont l'expérience de ces techniques de biologie moléculaire.

### **3.3 Application de la PCR en temps réel au diagnostic de la toxoplasmose du patient immunodéprimé**

Quelques études cliniques ont été réalisées afin d'analyser l'intérêt de la quantification de la charge parasitaire lors d'une toxoplasmose disséminée. Cependant, ces études sont récentes et il n'y a pas encore de recul suffisant pour savoir si la charge parasitaire a une valeur pronostic ou non.

La première étude clinique a concerné quatre patients allogreffés (Costa *et al*, 2000). Pour trois de ces patients il n'y a pas eu de diagnostic de toxoplasmose disséminée établi (absence de signes cliniques, données de l'imagerie normales) bien que des PCR effectuées sur sérum soient positives. Il semble donc qu'une réactivation toxoplasmique chez ce type de patients immunodéprimés, comme en témoigne la présence de toxoplasmes dans la circulation générale, n'implique pas forcément une toxoplasmose disséminée clinique ; ceci a d'ailleurs déjà été décrit (Bretagne *et al*, 2000). Rétrospectivement, plusieurs prélèvements de sang de ces patients sont analysés par PCR en temps réel : la charge parasitaire retrouvée est faible, à la limite du seuil de quantification.

Pour le quatrième patient qui présente des signes cliniques et radiologiques d'encéphalite, la charge parasitaire dans le sang est importante et augmente tandis que l'état clinique s'aggrave (de 1 toxoplasme/200 µl de sérum à 397 toxoplasmes/200 µl de sérum). La PCR effectuée sur LCR rapporte également un nombre important de parasites (4240 toxoplasmes/200 µl de LCR).

Ainsi, grâce à la quantification de la charge parasitaire, il serait possible de distinguer rapidement les patients qui risquent de développer une forme grave de toxoplasmose disséminée, de les traiter immédiatement et de suivre l'efficacité du traitement instauré.

L'étude de Kupferschmidt et al (Kupferschmidt *et al*, 2001) porte sur un seul patient allogreffé. Cette étude montre que la PCR sur sang total se positive trois jours avant l'apparition des premiers signes cliniques (fièvre et céphalées). La charge parasitaire est quantifiée rétrospectivement : elle reste stable durant les premiers jours (autour de 100 toxoplasmes/ml de sang) puis diminue 2 jours après l'instauration du traitement. La PCR en temps réel permettrait ainsi la surveillance du traitement.

Botterel et al (Botterel *et al*, 2002) ont suivi une patiente après une greffe hépatique. Cette patiente se dégrade rapidement après la greffe. L'examen direct du LBA est négatif à J27 et met en évidence à J42 des toxoplasmes ; un traitement par pyriméthamine et sulfadiazine est alors instauré mais la patiente décède à J50. Rétrospectivement des échantillons de LBA et de sang sont analysés par PCR en temps réel. A J27 la charge parasitaire dans le LBA est de 500 toxoplasmes/ml et elle augmente jusqu'à 7500 toxoplasmes/ml à J42.

Ce travail montre tout d'abord l'intérêt de la PCR qui se révèle plus sensible que l'examen direct. De plus, l'évolution de la charge parasitaire serait corrélée à la progression de la toxoplasmose et permettrait donc de préciser le pronostic.

Une autre étude rétrospective compare une méthode de PCR classique et une méthode de PCR en temps réel pour le diagnostic d'une toxoplasmose cérébrale chez un sujet bénéficiant d'une greffe de moelle osseuse (Menotti *et al*, 2003). Plusieurs types de prélèvements biologiques sont analysés (sang total, sérum, LCR) avant et jusqu'à 220 jours après la greffe. Cinquante quatre résultats sur soixante deux sont concordants entre ces deux méthodes.

Les premiers signes cliniques de toxoplasmose cérébrale apparaissent chez le patient 40 jours après la greffe tandis que les premières PCR positives ont lieu 4 jours plus tôt. Un traitement est mis en place le 43<sup>ème</sup> jour post greffe et la charge parasitaire diminue le 48<sup>ème</sup> jour alors qu'elle avait fortement augmenté depuis le 36<sup>ème</sup> jour (de 86 à 26000 parasites par ml de sang). Le patient s'améliore sur le plan clinique assez rapidement. La dernière PCR positive a lieu le 91<sup>ème</sup> jour.

Cette étude montre à nouveau que la charge parasitaire semble corrélée à l'efficacité du traitement et que la persistance des PCR positives sur plusieurs semaines a entraîné la mise en place d'un traitement long.

L'étude rétrospective la plus récente concerne 106 patients allogreffés (Martino *et al*, 2005). Il y a une réactivation toxoplasmique (mise en évidence par des PCR positives sur

sang périphérique) chez 16 d'entre eux. Sur ces 16 patients, seulement 6 développent une toxoplasmose clinique (arguments cliniques, biologiques et radiologiques). Pour les 10 patients sans symptomatologie particulière, la charge parasitaire est plutôt faible et reste stable jusqu'à la mise en place d'un traitement ; à partir de là, cette charge diminue puis devient nulle. Au contraire, dans les cas de toxoplasmoses invasives confirmées, il y a une augmentation de la charge parasitaire et celle-ci précède l'aggravation clinique de 4 à 9 jours. Par exemple, pour un de ces patients, la charge parasitaire dans le sang passe de 286 toxoplasmes/ml à J48 à 4059 toxoplasmes/ml à J61. Les premiers signes cliniques apparaissent à J63 date à laquelle un traitement est instauré. A partir de ce moment, la charge parasitaire diminue et devient nulle à J80. Ainsi, grâce à l'évolution de la charge parasitaire, il serait possible d'identifier les patients qui sont le plus à risque de développer une toxoplasmose clinique sévère puis de surveiller l'efficacité du traitement instauré.

En résumé, ces premières études révèlent que la quantification de la charge parasitaire dans le sang des patients immunodéprimés permettrait dans un premier temps de savoir s'il y a une réactivation toxoplasmique. Puis, dans un deuxième temps, en analysant l'évolution de cette charge, il serait possible de distinguer les patients à risque de développer une toxoplasmose clinique grave. La PCR quantitative aurait donc une valeur pronostic. Cependant, elle ne permet pas encore d'intervenir directement dans la décision de mise en place ou non d'un traitement chez les patients qui auraient une simple réactivation sans signes cliniques associés (Chandrasekar, 2005).

De plus, en ce qui concerne le traitement instauré lors d'une toxoplasmose disséminée, ces études indiquent que son efficacité pourrait être surveillée grâce à l'évolution de la charge parasitaire et que la durée du traitement serait guidée par les données de la PCR en temps réel.

La mise en place des techniques de PCR en temps réel est très récente et il est nécessaire que d'autres études cliniques soient réalisées pour dresser des conclusions claires mais les perspectives sont nombreuses et encourageantes. Cette nouvelle technologie rapide, sensible et spécifique a désormais sa place dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale et de la toxoplasmose du patient immunodéprimé.

---

# Objectifs

Le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale est fondamental car il permet d'instaurer un traitement réduisant la gravité des lésions fœtales (Foulon *et al*, 1999). Il repose sur des méthodes traditionnelles de mise en évidence de *T. gondii* dans le liquide amniotique (inoculation à la souris et culture cellulaire) mais surtout sur des techniques de PCR.

La PCR en temps réel (RT-PCR) est une technique quantitative sensible, rapide, avec des applications multiples, notamment dans le domaine de la microbiologie (Tse *et al*, 2003). Deux études récentes suggèrent l'intérêt de la PCR en temps réel dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale afin de préciser le risque de séquelles fœtales par la recherche de la charge parasitaire dans le liquide amniotique (Costa *et al*, 2001 ; Romand *et al*, 2004).

L'objectif de ce travail était d'adapter une PCR classique amplifiant le gène B1 en présence d'un véritable contrôle interne (Pelloux *et al*, 1996) afin de développer une PCR en temps réel permettant la détection et la quantification de *T. gondii* dans le liquide amniotique. Pour cela, une première étape utilisant le SYBR Green I comme agent de détection des amplifications a permis d'optimiser certains paramètres techniques (nombre de copies du contrôle interne, conditions de l'amplification). Puis, l'étape de détection a été effectuée avec deux couples de sondes FRET en tandem. Une série de dilutions d'une suspension de toxoplasmes dans le liquide amniotique a permis tout d'abord d'établir une droite d'étalonnage en présence du contrôle interne. Les caractéristiques techniques (spécificité, reproductibilité, sensibilité) ont été ensuite recherchées puis la PCR a été évaluée grâce à un modèle expérimental d'échantillons de liquides amniotiques artificiellement contaminés.

L'amplification dans des protocoles de PCR d'un gène de 529 bases répété plus de 200 fois dans le génome de *T. gondii* permettrait d'obtenir un gain en sensibilité (Filisetti *et al*, 2003 ; Homan *et al*, 2000). Le deuxième objectif de ce travail était donc de développer en parallèle et selon la même démarche, une PCR en temps réel amplifiant ce gène de 529 bases en présence d'un contrôle interne, la  $\beta$  globine.

---

## **Matériel et méthodes**

# 1. Obtention des toxoplasmes

## 1.1 Souche RH

La souche virulente RH de Sabin est entretenue au laboratoire sur des souris femelles (Swiss-OF1, IFFA-CREDO, France). Ces souris sont infectées par voie intrapéritonéale par 200 µl du sérum physiologique contenant les parasites. Trois jours après l'inoculation, l'ascite des souris malades contenant les tachyzoïtes est ponctionnée puis diluée. Une partie est injectée à des souris saines afin de conserver cette souche. L'autre partie est cultivée sur des fibroblastes humains de la lignée MRC5 (ATCC CCL-171, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Les fibroblastes humains sont mis en culture dans des falcons contenant 18,2 ml de milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté par 2 % de sérum synthétique Ultrosér G (Life Technologies, Eragny, France), 2 % de L-glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 500 U/ml de pénicilline et 0,25 mg/ml de streptomycine. La culture est réalisée à 37°C dans une atmosphère humide et enrichie en CO<sub>2</sub> (5%). Au bout de 24 heures de culture, les fibroblastes sont à confluence. Les tachyzoïtes alors sont récupérés par ponction du liquide d'ascite chez la souris infectée trois jours auparavant. Après lavages dans du PBS, la suspension de tachyzoïtes est ajoutée à ces fibroblastes MRC5 à confluence. Trois jours plus tard, alors que les fibroblastes sont lysés, le surnageant de la culture dans lequel se trouvent les tachyzoïtes est récupéré et lavé dans du PBS. Les parasites sont alors comptés en cellule de Malassez.



## 1.2 Souche Prugniaud

La souche Prugniaud infecte la souris de manière chronique. Six semaines après l'infection, le cerveau de la souris dans lequel se trouve les kystes est récupéré, broyé puis lavé dans du PBS. Les kystes sont purifiés grâce à un gradient discontinu de Percoll® (Amersham-Pharmacia, Orsay, France). Ce gradient est constitué d'une couche inférieure de 1,5 ml de Percoll® 90%, d'une couche intermédiaire de Percoll® 30% et d'une couche de 10 ml de broyat de cerveau. Après centrifugation, les deux couches de Percoll® sont récupérées et lavées dans du PBS. Les hématies restantes sont lysées par la saponine 0,1% et les kystes par la trypsine 0,25%. Le culot de centrifugation est repris dans un ml de PBS. Les bradyzoïtes sont alors comptés en cellule de Malassez.

## 2. Extraction de l'ADN de *T. gondii*

### 2.1 Méthode classique phénol/chloroforme

Le culot cellulaire obtenu après centrifugation de l'échantillon à extraire (5 minutes à 14000 g) est incubé une heure à 55°C dans 200 µl du tampon de lyse cellulaire (Tris 100 mmol/l ; EDTA 0,5 mmol/l ; SDS 0,2% ; NaCl 200mmol/l) additionné de protéinase K à la concentration de 10 mg/ml. Puis du phénol est ajouté volume à volume et la phase aqueuse est récupérée après une étape de centrifugation (5 minutes à 14000 g). Le mélange phénol/chloroforme est ensuite ajouté, volume à volume, et enfin, après une nouvelle étape de centrifugation, l'ADN est précipité par l'éthanol absolu froid (2,5 volumes) additionné d'acétate de sodium 3 mol/l (1/10 du volume de l'échantillon). Pour finir, le culot d'ADN obtenu est séché et resolubilisé dans un faible volume d'eau stérile (20 µl). L'ADN est alors conservé à - 20°C.

Cette méthode peut s'appliquer à tous les types d'échantillons biologiques. Elle est utilisée dans cette étude pour extraire les suspensions de toxoplasmes issues de la culture

sur fibroblastes. La concentration de l'ADN extrait est déterminée par un dosage spectrophotométrique.

## **2.2 Méthode rapide par ébullition**

Le culot cellulaire obtenu après centrifugation (5 minutes à 14000 g) est incubé quatre minutes à 100°C dans 50 µl du tampon de lyse TNN (NaOH 10 mmol/l ; Tween-20 0,5% ; TNN 0,5%). Il est ensuite placé dans la glace pendant 30 minutes. Après une étape de centrifugation (10 minutes à 16000 g) le surnageant contenant l'ADN est récupéré (Hohlfeld *et al*, 1994). L'extrait obtenu ne se conserve pas.

Cette méthode est simple et rapide mais ne s'applique qu'à des échantillons peu cellulaires comme le LCR ou le liquide amniotique. Dans cette étude, cette méthode est utilisée pour extraire les échantillons qui constituent la gamme d'étalonnage .

## **2.3 « QIAamp DNA Mini kit » (Qiagen)**

Ce kit permet l'extraction puis la purification des acides nucléiques grâce à une membrane de silice à l'intérieur de mini colonnes de centrifugation. Le protocole s'applique à tous les liquides biologiques. Le protocole du fabricant est suivi étape par étape. Les prélèvements sont centrifugés (5 minutes à 14000 g) et le culot est remis en suspension dans 180 µl d'un premier tampon de lyse (tampon ATL du kit) dans lequel est ajoutée 20 µl de protéinase K (20 mg/ml). Après centrifugation, une seconde étape de lyse est réalisée (200 µl du tampon AL du kit) suivie d'une incubation de 10 minutes à 56°C. Puis 200 µl d'éthanol sont additionnés au mélange. La totalité du lysat est déposée sur une mini colonne de centrifugation et l'ADN se lie alors sélectivement à la membrane de silice se trouvant à l'intérieur de cette colonne. Après deux étapes de lavage (tampon AW1 et AW2), l'ADN est élué grâce à 200 µl du tampon de lavage AE.

Le volume d'éluion préconisé par le fabricant est 200 µl, or ce volume est largement supérieur au volume de la prise d'essai de la PCR (5 µl). D'autres volumes d'éluion sont testés, à savoir 50 et 100 µl afin de concentrer la quantité d'ADN extrait.

Cette méthode est utilisée dans cette étude pour extraire les échantillons qui constituent la gamme d'étalonnage ainsi que pour extraire les échantillons de liquide amniotique artificiellement infectés par des toxoplasmes (recherche de la limite de détection).

## **2.4 Dosage de l'ADN**

Le dosage de l'ADN s'effectue par la mesure de l'absorbance à 260 nm de l'échantillon extrait et il permet de contrôler l'étape d'extraction. Puis, en considérant que le génome d'un toxoplasme correspond à 100 fg d'ADN (Cornelissen *et al*, 1984), il est possible de calculer le nombre de génomes de *T. gondii* présents dans un échantillon donné à partir de la concentration d'ADN mesurée.

La limite de détection du spectrophotomètre utilisé est de l'ordre du ng/ $\mu$ l ; comme les échantillons constituant la gamme d'étalonnage et les échantillons de liquide amniotique artificiellement contaminés ont en théorie une concentration en ADN inférieure à cette limite de détection, l'ADN ne peut pas être mesuré par cette méthode et le contrôle de l'étape d'extraction n'est pas réalisable.

## **3. Amplification de l'ADN de *T. gondii* par PCR en temps réel**

L'amplification de l'ADN de *T. gondii* est réalisée par PCR en temps réel sur l'appareil LightCycler<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Deux techniques de PCR en temps réel sont mises au point en parallèle, chacune amplifie un gène cible différent : le gène B1 et le gène de 529 bases répété plus de 200 fois (Homan *et al*, 2000).

### 3.1 Amplification du gène B1 par les amorces JW 58 et JW 59

Le gène B1 est répété 35 fois dans le génome de *T. gondii*. Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble, une PCR conventionnelle amplifie un fragment de ce gène grâce aux amorces JW 58 et JW 59. Ce système inclut un véritable contrôle interne : il s'agit du plasmide pSYC44 possédant dans sa séquence un fragment de 242 bases amplifié par ce même couple d'amorces. La détection des amplifications est réalisée par une migration sur gel d'agarose. Il existe également une sonde nucléotidique appelée JW 60 marquée à la digoxigénine. Cette sonde permet la détection des amplicons par une étape d'hybridation sur plaque (Pelloux *et al*, 1996).

L'objectif de ce travail est d'utiliser les mêmes amorces et le même contrôle interne dans un système en temps réel.

#### 3.1.1 Amorces et sondes

Les amorces JW 58 et JW 59 amplifient un fragment de 301 bases. Leurs séquences sont détaillées dans le tableau II.

Gène cible	Séquences des amorces	Nombre de bases du fragment amplifié
B1	<b>JW 58</b> : 5'- AAGGGCTGACTCGAACCAGATGT-3' <b>JW 59</b> : 5'- GGGCGGACCTCTCTTGTCTCG-3'	301

Tableau II : Séquences des amorces JW 58 et JW 59

Le laboratoire Proligo® a réalisé la conception des deux sondes en tandem permettant la révélation spécifique du fragment cible. La première sonde, Tg 1, porte à son extrémité 3' la fluoescéine et la deuxième sonde, Tg 2, porte le fluorophore LC Red 640 en 5' tandis que son extrémité 3' est bloquée par un phosphate. Le tableau III détaille les séquences de ces sondes.

Fragment révélé par les sondes	Séquences des sondes
Fragment de 301 bases du gène B1	<b>Tg 1</b> :5'-GTCTAGGGCACCCCTTACTGCAAGAGAAG-fluorescéine <b>Tg 2</b> :5'-LCRed640-TTGAGGTCATATCGTCCCATGAAGTCGACC- P
Contrôle interne pSYC44	<b>CI 1</b> :5'-ACTGAGTCCAATACATAAGCACAGTCTTCCC-fluorescéine <b>CI 2</b> : 5'- LC Red705 – AAGTTGGGTATTTTCGTATGCGTAGCGATCC – P

**Tableau III** : séquence des sondes FRET en tandem

### 3.1.2 Le contrôle interne

Le contrôle interne est un plasmide possédant une séquence de 242 nucléotides amplifiée par les amorces JW 58 et JW 59. Il provient d'une solution mère à  $10^{12}$  copies/ $\mu$ l préparée lors de la mise au point de la PCR conventionnelle. Plusieurs dilutions sérielles de cette solution sont effectuées dans de l'eau stérile et permettent d'obtenir six solutions-filles ( $10^2$  à  $10^7$  copies de contrôle interne/ $\mu$ l). Ces différentes concentrations sont testées au cours de ce travail.

Deux sondes, CI 1 et CI 2, ont été recherchées afin de révéler spécifiquement le contrôle interne (tableau III). CI 1 est marquée par le fluorescéine tandis que CI 2 porte le fluorophore LC Red 705 en 5'.

### 3.1.3 Conditions d'amplification

Le volume du mélange réactionnel ne doit pas excéder 20  $\mu$ l : la réaction d'amplification s'effectue à l'intérieur de capillaires en verre ce qui exige de ne pas dépasser un tel volume.

Lorsque la détection est effectuée par les **sondes FRET en tandem**, le mélange réactionnel de la PCR contient :

- 2  $\mu$ l du mélange fourni par le kit « LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> Hybridization Probes® » (Roche Diagnostics, Meylan, France) contenant la Taq polymérase modifiée, le  $MgCl_2$ , le tampon de la réaction et les dNTP (dUTP à la place de dTTP). La Taq polymérase utilisée a subi une modification chimique (procédure « hot start ») de manière à être inactive à

température ambiante et retrouver une activité après une incubation de dix minutes à 95°C

- 0,5 µmol/l de chacune des deux amorces JW 58 et JW 59 (1 µl d'une solution à 10 µmol/l)
- 0,2 µmol/l de chacune des quatre sondes Tg 1, Tg 2, CI 1 et CI 2 (1 µl d'une solution à 4 µmol/l)
- 1 µl de contrôle interne ( $10^2$  à  $10^7$  copies/µl)
- 1 µl d'UNG soit une unité d'UNG (Roche Diagnostics, Meylan, France)
- 5 µl d'échantillon extrait (remplacé par 5 µl d'eau stérile pour réaliser le témoin négatif)
- 5 µl d'eau stérile

Lorsque la détection s'effectue par le **SYBR Green I**, le mélange réactionnel de la PCR contient :

- 2 µl du mélange fourni par le kit « LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I® » (Roche Diagnostics, Meylan, France) contenant la Taq polymérase modifiée, le MgCl<sub>2</sub>, le tampon de la réaction, les dNTP (dUTP à la place de dTTP) et le SYBR Green I.
- 0,5 µmol/l de chacune des deux amorces JW 58 et JW 59 (1 µl d'une solution à 10 µmol/l)
- 1 µl de contrôle interne ( $10^2$  à  $10^7$  copies/µl)
- 1 µl d'UNG soit une unité d'UNG
- 5 µl d'échantillon extrait (remplacé par 5 µl d'eau stérile pour réaliser le témoin négatif)
- 9 µl d'eau stérile

Chaque PCR débute par une incubation à température ambiante pendant cinq minutes. En effet, il n'y a pas de désoxythymidines triphosphate (dTTP) dans notre mélange réactionnel mais des désoxyuridines triphosphate (dUTP) car les techniques de PCR fonctionnent avec de l'UNG qui clive les liaisons N-glycosidique au niveau de l'uracile. L'incubation à température ambiante permet l'action de l'UNG. Puis une étape de dénaturation à 95°C pendant dix minutes permet à la fois l'inactivation de l'UNG et l'activation de la Taq polymérase.

Enfin, l'amplification de l'ADN comprend 40 cycles, chacun de ces cycles est divisé en trois étapes :

- dénaturation de l'ADN : 10 secondes à 95°C

- hybridation des amorces : 10 secondes entre 55°C et 65°C
- élongation par la Taq polymérase : 12 secondes à 72°C

La température d'hybridation est fixée à 70°C dans le protocole de PCR conventionnelle mais cette température n'est pas compatible avec l'utilisation des sondes FRET en tandem et doit être optimisée. Des températures d'hybridation moins élevées sont donc évaluées : 55°C, 60°C, 62°C et 65°C. La température retenue est 62°C.

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier leur nombre de bases. Un gel d'agarose à 2% est réalisé dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mmol ; EDTA 1 mmol) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). La migration se déroule pendant 45 minutes (à 130V environ). Puis les migrations sont observées sous éclairage UV et la taille des fragments amplifiés est estimée grâce à la migration d'un marqueur de poids moléculaire (1 Kb DNA ladder, Gibco BTL).

## 3.2 Amplification du gène de 529 bases

Le deuxième gène amplifié possède 529 bases, il est répété 200 à 300 fois dans le génome de *T. gondii* (Homan *et al*, 2000).

### 3.2.1 Amorces et sondes

Les amorces décrites par Homan et al (Homan *et al*, 2000) n'ont pas été utilisées car il n'a pas été possible de concevoir deux sondes FRET en tandem spécifiques du fragment amplifié. Un nouveau système amorces/sondes a donc été conçu par Proligo®. Les amorces sont appelées Tg F et TG R et amplifient un fragment de 263 bases (tableau IV).

Gène cible	Séquences des amorces	Nombre de bases du fragment amplifié
Gène de 529 bases	Tg R : 5' -TATCAGGACTGTAGATGAAGGC-3' Tg F : 5'-TCTGGATTCTCTCTACC-3'	263

Tableau IV : Séquences des amorces Tg R et TgF

Les deux sondes conçues par Proligo® se nomment TOXOflo et TOXOred. La première sonde porte en 3' la fluorescéine et la deuxième sonde porte en 5' le LC Red 640 (tableau V).

Séquences des sondes
TOXOflo : 5'- GAGACACCGGAATGCGATCC- fluorescéine
TOXOred : 5' - LC Red 640 – ACGAGACGACGCTTTCCT – P

Tableau V : séquence des sondes FRET en tandem

### 3.2.2 Le contrôle interne

Le contrôle interne est un fragment de 110 bases du gène humain de la  $\beta$  globine. Le gène de la  $\beta$  globine est ajouté directement au mélange réactionnel. Il ne s'agit pas d'un véritable contrôle interne puisqu'il n'est pas amplifié par les amorces spécifiques du gène cible de *T. gondii*.

Le kit « LightCycler® Control Kit DNA » (Roche Diagnostics, Meylan, France) est utilisé. Il fournit le gène de la  $\beta$  globine, les amorces permettant l'amplification de ce fragment et un couple de sondes fonctionnant avec le système fluorescéine/LC Red 705. Les séquences des sondes et amorces ainsi que leur concentration ne sont pas connues.

### 3.2.3 Conditions d'amplification

Lorsque la détection est effectuée par les **sondes FRET en tandem**, le mélange réactionnel de la PCR contient :

- 2  $\mu$ l du mélange fourni par le kit « LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> Hybridization Probes® »
- 0,5  $\mu$ mol/l de chacune des deux amorces Tg F et Tg R (1  $\mu$ l d'une solution à 10  $\mu$ mol/l)



- 0,2  $\mu\text{mol/l}$  de chacune des deux sondes TOXOflo et TOXOred (1  $\mu\text{l}$  d'une solution à 4  $\mu\text{mol/l}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  de la solution contenant les amorces du gène de la  $\beta$  globine fournie par le kit « LightCycler® Control Kit DNA »
- 2  $\mu\text{l}$  de la solution contenant les sondes révélant l'amplification du gène de la  $\beta$  globine et fournie par le kit « LightCycler® Control Kit DNA »
- 2  $\mu\text{l}$  de la solution contenant le gène de la  $\beta$  globine (500 copies/ $\mu\text{l}$ ) fournie par le kit « LightCycler® Control Kit DNA »
- 1  $\mu\text{l}$  d'UNG soit une unité d'UNG
- 5  $\mu\text{l}$  d'échantillon extrait (remplacé par 5  $\mu\text{l}$  d'eau stérile pour réaliser le témoin négatif)
- 2  $\mu\text{l}$  d'eau stérile

Lorsque la détection s'effectue par le **SYBR Green I**, le mélange réactionnel de la PCR contient :

- 2  $\mu\text{l}$  du mélange fourni par le kit « LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I® »
- 0,5  $\mu\text{mol/l}$  de chacune des deux amorces Tg F et Tg R (1  $\mu\text{l}$  d'une solution à 10  $\mu\text{mol/l}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  de la solution contenant les amorces du gène de la  $\beta$  globine fournie par le kit « LightCycler® Control Kit DNA »
- 2  $\mu\text{l}$  de la solution contenant le gène de la  $\beta$  globine (500 copies/ $\mu\text{l}$ ) fournie par le kit « LightCycler® Control Kit DNA »
- 1  $\mu\text{l}$  d'UNG soit une unité d'UNG
- 5  $\mu\text{l}$  d'échantillon extrait (remplacé par 5  $\mu\text{l}$  d'eau stérile pour réaliser le témoin négatif)
- 6  $\mu\text{l}$  d'eau stérile

Chaque PCR débute également par une incubation à température ambiante pendant cinq minutes suivie d'une dénaturation de l'UNG à 95°C pendant dix minutes. L'amplification de l'ADN comprend 40 cycles comportant chacun 3 étapes :

- dénaturation de l'ADN : 10 secondes à 95°C
- hybridation des amorces : 10 secondes à 60°C
- élongation par la Taq polymérase : 12 secondes à 72°C

Les produits d'amplification sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier leur taille.

## 3.3 Détection des amplifications par le LightCycler®

### 3.3.1 Détection par le SYBR Green I

La génération des amplicons est suivie par la mesure de la fluorescence émise par le SYBR Green I à 530 nm. Cette mesure est effectuée en fin de chaque étape d'élongation. La lecture du signal se fait sur le canal F1 de l'appareil et l'analyse est effectuée par la méthode « Second derivative maximum » : le logiciel informatique définit un bruit de fond de la fluorescence et identifie les échantillons positifs (c'est à dire ceux dont la fluorescence dépasse le bruit de fond) en précisant leur Cp.

### 3.3.2 Détection par les sondes FRET en tandem

L'association de deux couples de sondes FRET en tandem permet de suivre simultanément l'amplification du fragment cible de l'ADN de *T. gondii* et l'amplification du contrôle interne.

Les mesures des fluorescences émises sont réalisées lors de l'étape d'hybridation. L'amplification de l'ADN de *T. gondii* est suivie par la mesure de la fluorescence émise par le fluorophore LC Red 640 (à 640 nm, canal F2 de lecture) et l'amplification du contrôle interne est suivie par la mesure de la fluorescence émise par le fluorophore LC Red 705 (à 705 nm, canal F3 de lecture). Un fichier de compensation permet de retrancher la fluorescence du LC Red 705 à la fluorescence du LC Red 640 lorsque c'est le signal de ce dernier qui est mesuré et inversement (canal de lecture F2/F1 pour la détection de *T. gondii* et F3/F1 pour la détection du contrôle interne).

L'analyse des fluorescences est effectuée par le logiciel selon la méthode « Second derivative maximum ».

## 4. Evaluation des caractéristiques de la PCR en temps réel

### 4.1 Les droites d'étalonnage

#### 4.1.1 Préparation de la gamme d'étalonnage à partir de dilutions d'ADN

Les tachyzoïtes de la souche RH sont récupérés après culture sur fibroblastes et l'ADN est extrait par la méthode classique. Le dosage de l'ADN au spectrophotomètre permet de déduire le nombre de génomes présents dans cette solution extraite. Une série de dilutions successives est ensuite réalisée dans de l'eau stérile pour obtenir 6 échantillons contenant 1 à  $10^5$  génomes pour 5  $\mu$ l.

#### 4.1.2 Préparation de la gamme d'étalonnage à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes

- **Extraction par le kit Qiagen** : les tachyzoïtes de la souche RH issus d'une culture sur fibroblastes MRC5 sont récupérés puis comptés en cellule de Malassez. A partir du résultat obtenu (exprimé en nombre de toxoplasmes/ml de suspension), une série de dilutions est réalisée pour obtenir six suspensions contenant 40 à  $4 \cdot 10^6$  toxoplasmes/ml. Les dilutions s'effectuent dans différents milieux : PBS, sérum physiologique ou liquide amniotique (le liquide amniotique provient d'une femme séronégative pour la toxoplasmose, la PCR conventionnelle utilisant les amorces JW 58 et JW 59 est négative). Puis 1 ml de chacun de ces six échantillons est extrait individuellement par le kit Qiagen. Sur les 200  $\mu$ l d'éluat contenant l'ADN extrait, seulement 5  $\mu$ l sont ajoutés au

mélange réactionnel de la PCR. Les six échantillons qui constituent la gamme d'étalonnage contiennent ainsi 1 à  $10^5$  parasites par prise d'essai PCR.

- **Extraction par la méthode rapide** : les tachyzoïtes de la souche RH issus d'une culture sur fibroblastes MRC5 sont comptés en cellule de Malassez puis une série de dilutions de raison 10 est réalisée pour obtenir six suspensions contenant  $10^1$  à  $10^6$  toxoplasmes/ml. Les dilutions s'effectuent dans différents milieux : PBS, sérum physiologique ou liquide amniotique. Puis 1 ml de chacun de ces six échantillons est extrait individuellement par la méthode rapide. Sur les 50  $\mu$ l d'éluat contenant l'ADN extrait, 5  $\mu$ l sont ajoutés au mélange réactionnel de la PCR. Les six échantillons qui constituent la gamme d'étalonnage contiennent ainsi 1 à  $10^5$  parasites par prise d'essai PCR.

#### 4.1.3 Validation des droites d'étalonnage

Plusieurs paramètres sont recherchés afin de valider les droites d'étalonnage obtenues à partir des six échantillons constituant la gamme. La reproductibilité de ces paramètres est étudiée sur cinq PCR.

- **L'efficacité d'amplification E** : en théorie, la répétition de n cycles de PCR aboutit à une accumulation exponentielle théorique de  $2^n$  par molécule d'ADN et E prend alors la valeur de 2. Mais, dans les conditions expérimentales, E est rarement égal à 2 et varie souvent entre 1,78 et 1,97. En considérant la droite d'étalonnage représentant le cycle seuil en fonction du nombre de toxoplasmes présents dans l'échantillon, E peut se calculer grâce à la relation suivante :  $E = 10^{(-1/\text{pente})}$ . E doit se rapprocher le plus possible de 2 (Wilkening *et al*, 2004).
- **La pente de la droite** : la pente de la droite d'étalonnage doit s'approcher de -3,3 afin d'obtenir une efficacité d'amplification optimale proche de 2.
- **Le coefficient de régression linéaire r** : il doit être supérieur ou égal à 0,98 pour conclure à une corrélation entre deux paramètres.

## 4.2 Reproductibilité de la PCR en temps réel

Le cycle seuil (Cp) est le paramètre choisi afin d'étudier la reproductibilité de la PCR en temps réel.

La reproductibilité inter-essai est évaluée sur six dilutions d'une suspension de toxoplasmes dans le liquide amniotique. Ces échantillons sont préparés de la même façon que les échantillons constituant la gamme d'étalonnage. Chacun de ces échantillons est extrait individuellement avec le kit Qiagen® et testé dans cinq PCR différentes. La reproductibilité intra-essai s'est effectuée également sur six échantillons de liquide amniotique ; chaque échantillon est extrait individuellement et testé cinq fois dans la même série de PCR.

## 4.3 Spécificité de la PCR en temps réel

Plusieurs microorganismes sont testés afin de contrôler la spécificité des méthodes mises au point. Il s'agit de pathogènes pouvant se retrouver chez la femme enceinte ou chez le patient immunodéprimé :

- *Listeria monocytogenes* ( $6,1 \cdot 10^5$  génomes/5  $\mu$ l) : souche humaine, ADN extrait par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Grenoble
- *Escherichia coli* K1 ( $7 \cdot 10^5$  génomes/5  $\mu$ l) : souche humaine, ADN extrait par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Grenoble
- *Cytomégalo virus* ( $10^6$  génomes/ $\mu$ l) : souche humaine, ADN extrait par le laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble
- *Herpes virus* de type 2 ( $10^3$  génomes/ $\mu$ l) : souche humaine, ADN extrait par le laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble
- *Candida albicans* ( $10^4$  génomes/ $\mu$ l) : souche CA IP 3153, ADN extrait par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble
- *Plasmodium falciparum* (26 ng d'AND/ $\mu$ l) : souche humaine SGE1, ADN extrait par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble
- *Aspergillus fumigatus* (1 ng d'ADN/ $\mu$ l) : souche humaine, ADN extrait par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble

- *Leishmania infantum* ( $6.10^4$  génomes/ $\mu$ l) : souche humaine, ADN extrait par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier

#### **4.4 Amplification de la souche Prugniaud**

Comme le travail est réalisé en amplifiant l'ADN de *T. gondii* de la souche RH, il est nécessaire de confirmer que la PCR s'applique à une autre souche toxoplasmique. Des kystes de la souche Prugniaud sont récupérés dans le cerveau d'une souris infectée de manière chronique. Après des étapes de broyage et de lavage, une suspension de bradyzoïtes est obtenue (500 bradyzoïtes/ $\mu$ l) et l'ADN est extrait avec le kit Qiagen à partir de 10  $\mu$ l de cette suspension. Une PCR est alors effectuée à partir d'une prise d'essai de 5 $\mu$ l.

### **5. Evaluation de la PCR sur des prélèvements artificiels de liquide amniotique**

Afin de connaître la limite de détection biologique des techniques de PCR en temps réel, des échantillons de liquide amniotique artificiellement contaminés sont préparés de manière à se rapprocher le plus possible des conditions associées, en pratique, à l'étude d'un liquide amniotique.

Une suspension de toxoplasmes issus d'une culture sur fibroblastes est réalisée dans du liquide amniotique. Après comptage des toxoplasmes en cellule de Malassez, des dilutions en série sont effectuées de manière à obtenir une suspension finale contenant 20 toxoplasmes/ml. Puis la dilution au 1/2, 1/4, 1/5, 1/10 et 1/20 de cette suspension dans du liquide amniotique permet d'obtenir cinq autres suspensions contenant respectivement 10, 5, 4, 2 et 1 toxoplasme/ml de liquide amniotique ; 1 ml de chacun de ces six échantillons artificiellement contaminés est extrait par le kit Qiagen.

Dans une première expérience, dix PCR sont réalisées sur chaque échantillon d'ADN extrait.

Puis deux autres séries de six échantillons de liquide amniotique sont réalisées. Trois PCR sont réalisées sur chaque échantillon d'ADN extrait afin de se rapprocher des conditions d'analyse du laboratoire. Lors de l'analyse de la dernière série, une PCR (sur trois) est effectuée sans la présence du contrôle interne.

## **6. Protocoles**

### **6.1 PCR en temps réel avec les amorces JW58 et JW59**

Une première étape utilisant le SYBR Green I comme agent de détection permet d'optimiser certains paramètres techniques comme le nombre de copies du contrôle interne à inclure par réaction PCR ou la température d'hybridation.

Puis, la mise au point des droites d'étalonnage, l'évaluation des caractéristiques de la PCR et l'application à des échantillons de liquide amniotique artificiellement contaminés sont réalisées avec la détection par les sondes FRET en tandem.

### **6.2 PCR en temps réel avec les amorces Tg F et Tg R**

L'amplification de l'ADN de *T. gondii* par les amorces Tg R et Tg F en présence de  $\beta$  globine est tout d'abord évaluée grâce au système de détection utilisant le SYBR Green. Puis, la mise au point de l'étalonnage et l'évaluation de la PCR sont réalisées avec la détection par les sondes FRET en tandem.

---

# Résultats

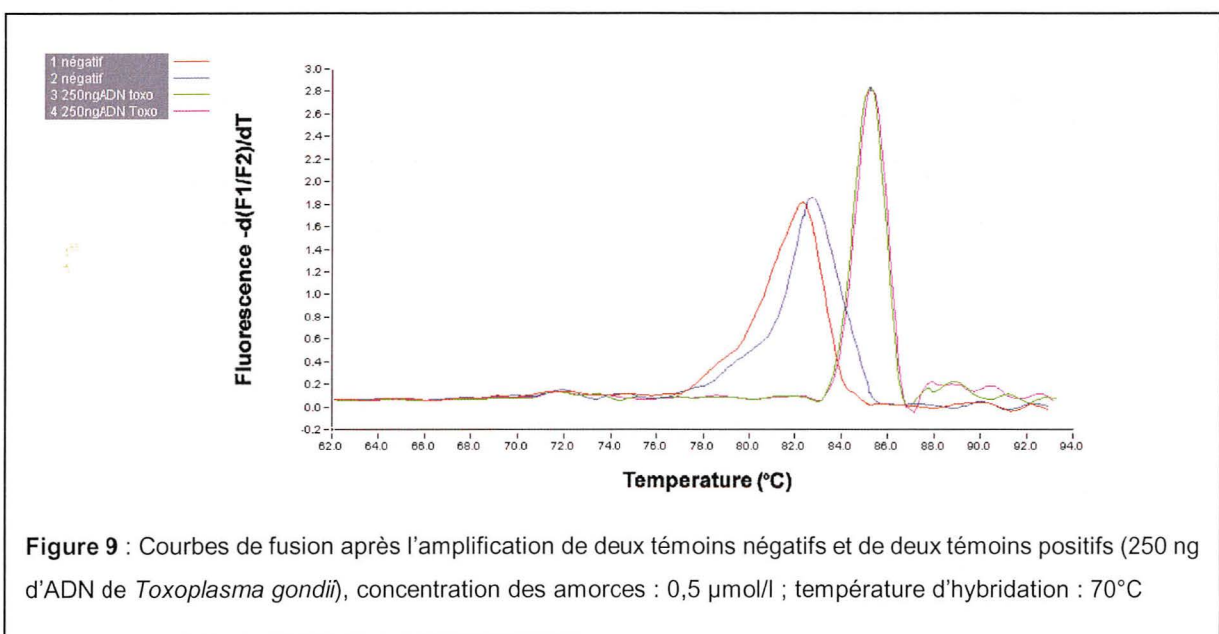


# 1. PCR en temps réel avec les amorces JW 58 et JW 59

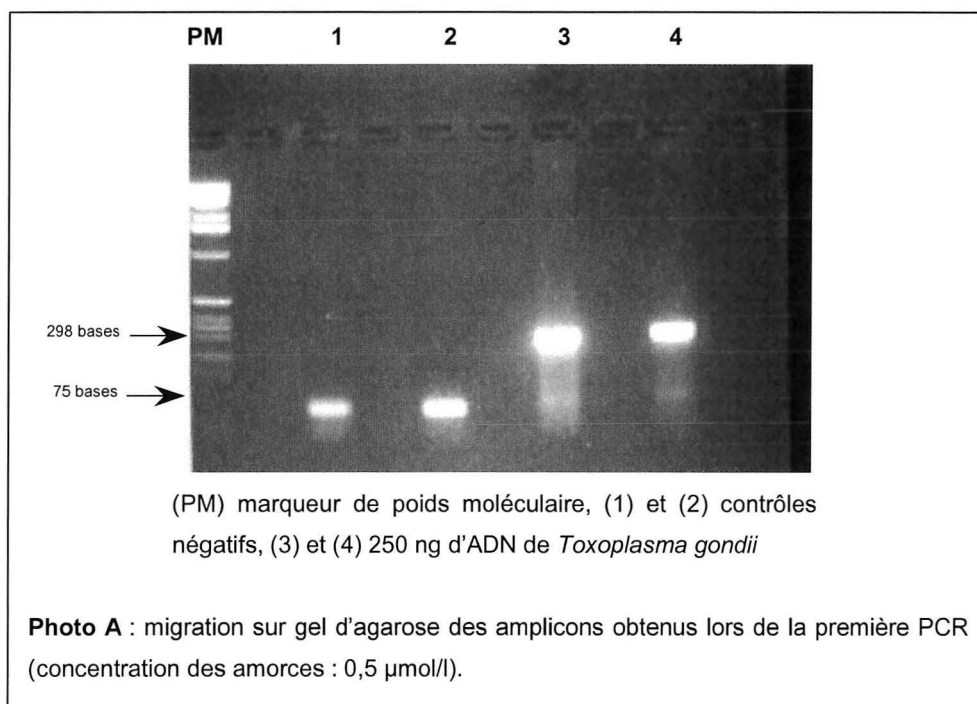
## 1.1 Optimisation des conditions de PCR avec le SYBR Green I

### 1.1.1 Optimisation de la concentration finale en amorces

Une première PCR est réalisée en amplifiant une quantité importante d'ADN de *T. gondii* (250 ng soit  $2,5 \cdot 10^6$  toxoplasmes) extrait par la méthode classique phénol/chloroforme. La courbe de fusion est réalisée en fin de PCR afin de connaître le  $T_m$  du fragment amplifié (figure 9).



L'analyse de la courbe de fusion met en évidence deux pics correspondant à deux températures de fusion. La réalisation d'un gel d'agarose et la migration des produits d'amplification permettent d'interpréter ces résultats : la visualisation d'un fragment de 301 bases indique que le fragment cible du gène B1 a bien été amplifié. Les pistes qui correspondent aux échantillons négatifs révèlent un fragment beaucoup plus court, possédant moins de 100 bases, très probablement des dimères d'amorces (photo A).



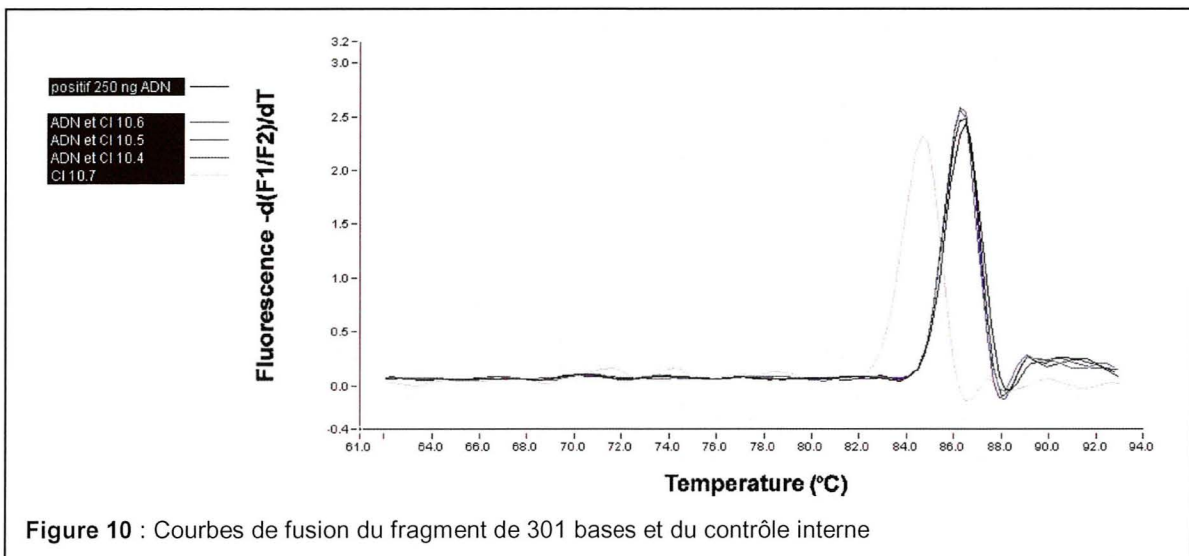
Afin de diminuer le phénomène de dimères d'amorces qui peut affecter la sensibilité de la PCR, quatre concentrations d'amorces (0,25 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5  $\mu\text{moles/l}$ ) sont testées. Le phénomène de dimères d'amorces se révèle être aléatoire car il ne s'est produit que dans le mélange réactionnel préparé avec une concentration d'amorces fixée à 0,3  $\mu\text{moles/l}$ . De plus, lorsque la concentration des amorces est 0,3 ou 0,25  $\mu\text{mol/l}$ , l'amplification de l'ADN de *T. gondii* n'est pas optimale (Cp tardifs). Il est donc décidé de conserver la concentration initiale en amorces soit 0,5  $\mu\text{moles/l}$ .

### 1.1.2 Introduction du contrôle interne

Le contrôle interne est ajouté au mélange réactionnel comprenant 250 ng d'ADN de *T. gondii* ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  ou  $10^4$  copies de plasmide par PCR).

L'analyse de la courbe de fusion (figure 10) révèle que le  $T_m$  du contrôle interne et celui du fragment de 301 bases du gène B1 sont proches ( $84,7^\circ\text{C}$  et  $86,6^\circ\text{C}$  respectivement). Ainsi, lorsque le contrôle interne et l'ADN de *T. gondii* sont amplifiés en même temps, il n'est pas possible de distinguer 2 pics sur la courbe de fusion, du fait des 2  $T_m$  extrêmement voisins. Une migration sur gel d'agarose 2% est alors nécessaire afin de déterminer la nature des amplifications. L'électrophorèse montre que dans certains cas ( $10^7$  et  $10^6$  copies du plasmide par PCR), l'ADN de *T. gondii* et le contrôle interne sont bien amplifiés en parallèle. Par contre, lorsque le nombre de copies du contrôle interne est  $10^5$  ou  $10^4$  par PCR, il n'y a pas d'amplification de ce fragment en présence de 250 ng d'ADN de *T. gondii*.

Ainsi, en présence d'une concentration importante d'ADN de *T. gondii*, le nombre de copies du plasmide doit être suffisamment important ( $10^6$  ou  $10^7$  copies) pour qu'il soit amplifié en parallèle.

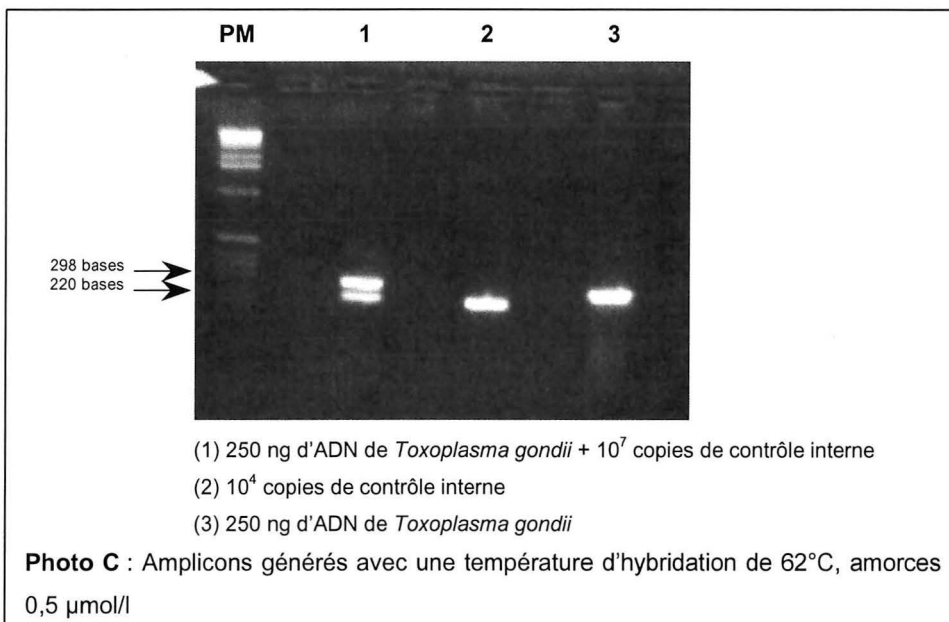
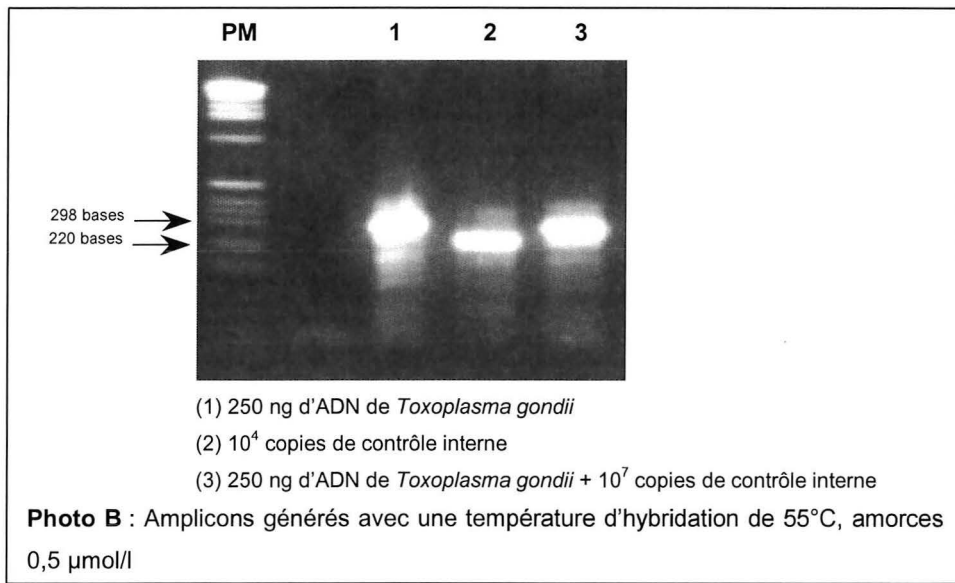


### 1.1.3 Optimisation de la température d'hybridation

Le passage à un système de détection par des sondes FRET en tandem nécessite l'optimisation de la température d'hybridation de la PCR (jusqu'à présent, cette

température était celle indiquée par le protocole de PCR classique, c'est à dire 70°C). Quatre températures d'hybridation sont testées : 65°C, 62°C, 60°C et 55°C.

L'analyse de chaque migration sur gel d'agarose montre tout d'abord que les fragments d'intérêt sont correctement amplifiés à chaque température d'hybridation testée. Cependant, plus la température d'hybridation est basse (55 et 60°C), plus il y a des hybridations non spécifiques visualisées par des « smears » sur le gel (photo B). De plus, en théorie, le phénomène de dimères d'amorces est optimal pour une température d'hybridation proche de 65°C ; ainsi, la température d'hybridation de 62°C est finalement retenue pour la réalisation des PCR suivantes (photo C).

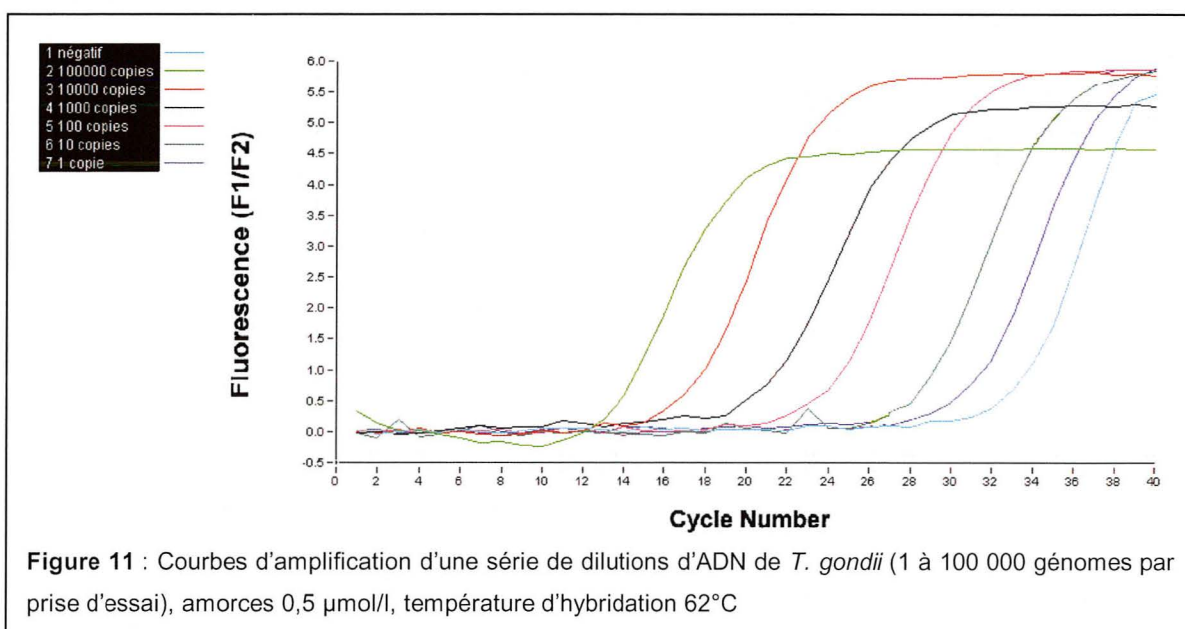


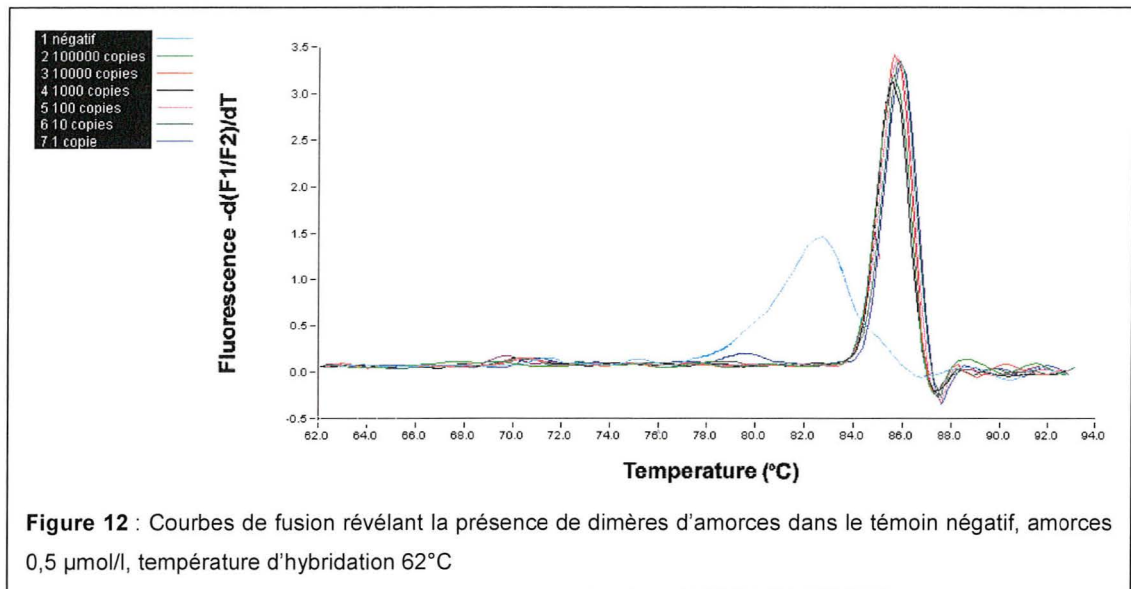
### 1.1.4 Droite d'étalonnage en SYBR Green I

Une série de dilutions d'ADN est réalisée dans de l'eau stérile afin d'obtenir 6 échantillons contenant 1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  et  $10^5$  génomes de *T. gondii* par prise d'essai PCR. Le contrôle interne n'est pas ajouté car le SYBR Green I ne permet pas de discerner le signal correspondant à l'amplification de l'ADN cible de celui correspondant à l'amplification du contrôle interne.

Chaque échantillon de la gamme est amplifié (figure 11) et la corrélation entre les cycles seuils et les concentrations en ADN est excellente :  $r = 0,998$ . L'efficacité de l'amplification E est calculée à partir de la valeur de la pente (-3,646) et prend la valeur de 1,88.

La courbe de fusion (figure 12) permet de vérifier la spécificité de l'amplification. Cette courbe met également en évidence un phénomène de dimères d'amorces dans l'échantillon correspondant au contrôle négatif.



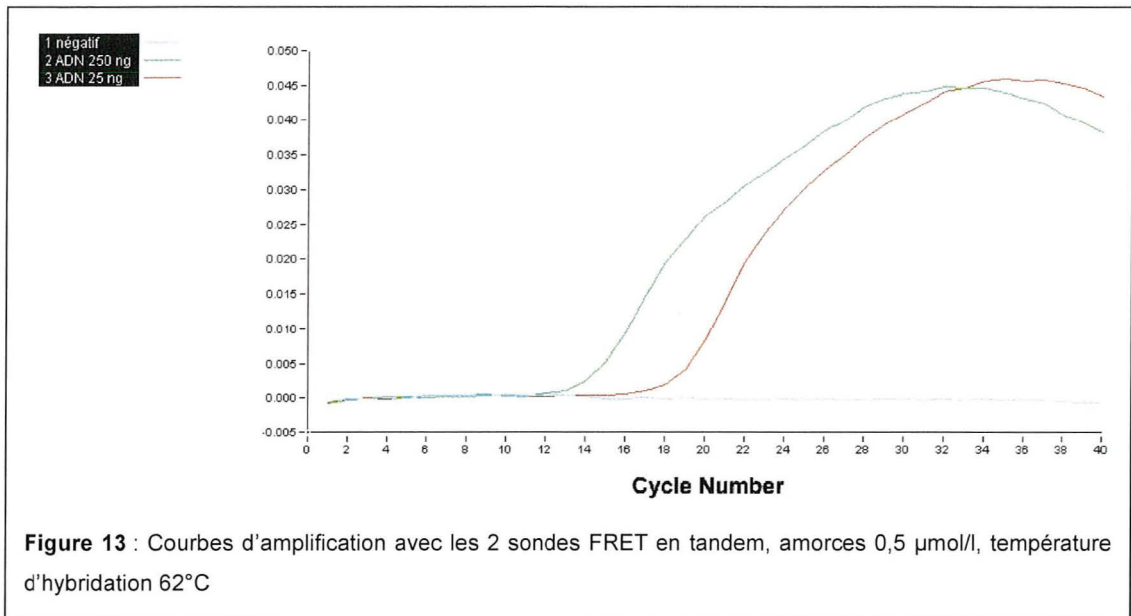


## 1.2 PCR en temps réel avec détection par les sondes en tandem

### 1.2.1 Les sondes FRET en tandem

Deux échantillons avec des concentrations élevées d'ADN de *T. gondii* (250 ng et 25 ng soit  $2,5 \cdot 10^6$  et  $2,5 \cdot 10^5$  toxoplasmes) sont amplifiés avec les amorces JW 58 et JW 59. La détection est effectuée par les deux sondes FRET en tandem (figure 13).

Les deux courbes d'amplification obtenues sont caractéristiques et les trois phases de la réaction (phases initiale, exponentielle et phase de plateau) sont bien visualisées.



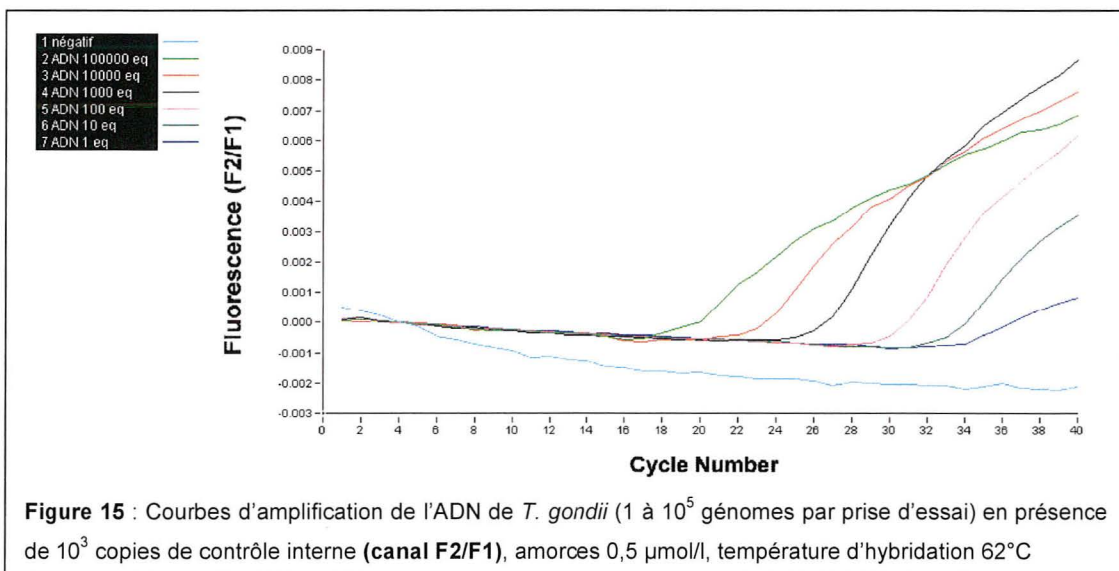
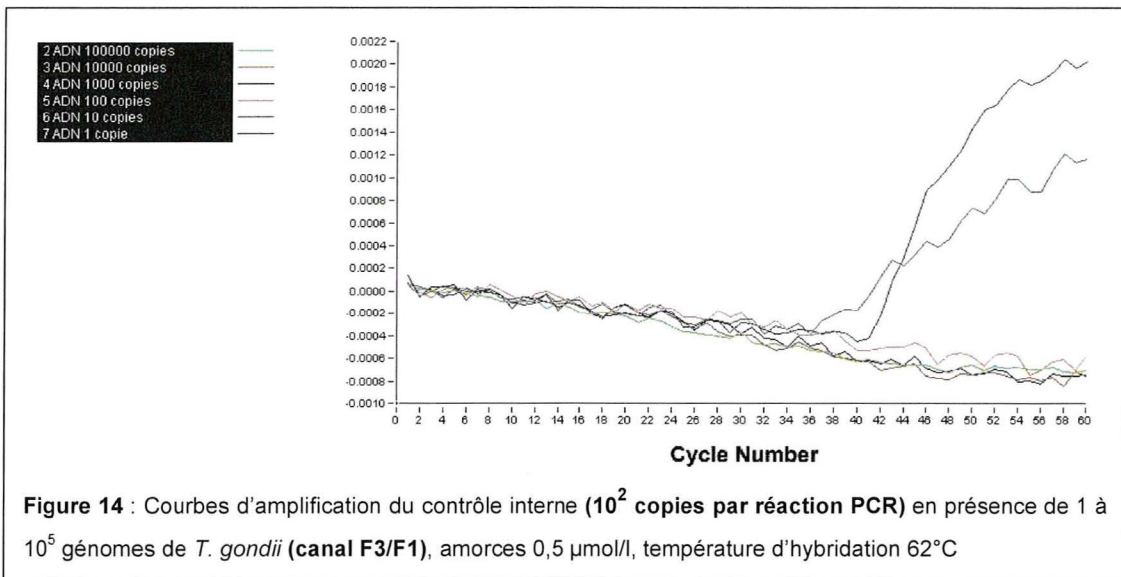
### 1.2.2 Optimisation du nombre de copies de contrôle interne

Une série de dilutions d'ADN de *T. gondii* est réalisée afin d'obtenir six échantillons contenant 1 à  $10^5$  génomes parasites/5  $\mu\text{l}$ . Ces six échantillons sont amplifiés à trois reprises en présence d'un nombre différent de copies de contrôle interne :  $10^5$ ,  $10^3$  ou  $10^2$  copies par PCR.

Lorsque  $10^5$  copies de contrôle interne sont ajoutées aux six mélanges réactionnels, les échantillons avec 1 et 10 génomes de *T. gondii* ne sont pas amplifiés. Par contre, le contrôle interne est toujours amplifié.

Lorsque  $10^2$  copies de contrôle interne sont ajoutées, l'ADN de *T. gondii* est amplifié dans les six échantillons mais les Cp des courbes de fluorescence du contrôle interne sont tardifs et l'aspect de ces courbes n'est pas satisfaisant (figure 14).

Lorsque  $10^3$  copies de contrôle interne sont ajoutées, l'ADN de *T. gondii* est amplifié dans les six échantillons (figure 15) tandis que le contrôle interne est amplifié dans les échantillons avec 1, 10 et 100 génomes de *T. gondii* ainsi que dans le contrôle négatif. Le travail est donc poursuivi avec  $10^3$  copies de contrôle interne par PCR.





### 1.2.3 Mise au point de la droite d'étalonnage à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes

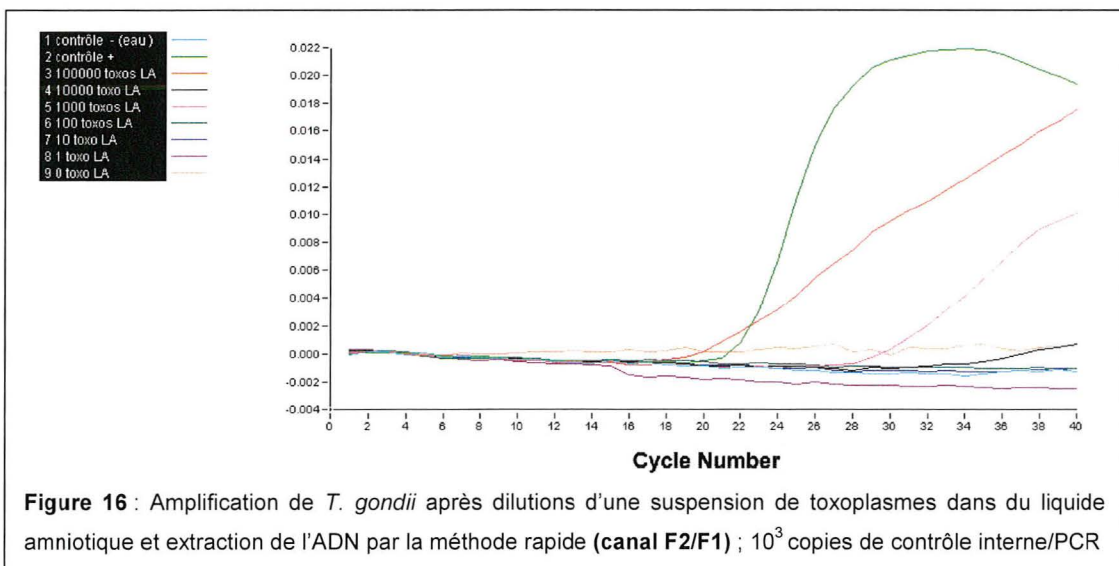
La mise au point de la droite d'étalonnage est réalisée à partir d'une série de dilutions d'une suspension de toxoplasmes suivie de l'extraction individuelle de chaque échantillon constituant la gamme d'étalonnage (1 à  $10^5$  toxoplasmes par prise d'essai).

#### Choix du milieu de dilution

Une suspension de toxoplasmes de la souche RH est d'abord diluée dans du PBS puis l'ADN est extrait par la méthode rapide par ébullition. Seul l'échantillon le plus concentré en toxoplasmes est amplifié ( $10^5$  toxoplasmes).

Une deuxième série de dilutions est effectuée dans du sérum physiologique mais aucun échantillon n'est amplifié.

Une troisième série de dilutions est réalisée dans du liquide amniotique. Chaque échantillon est ensuite extrait par la méthode rapide par ébullition. Trois échantillons sur six sont amplifiés et détectés par le LightCycler® (figure 16). Le milieu de dilution retenu est donc le liquide amniotique.

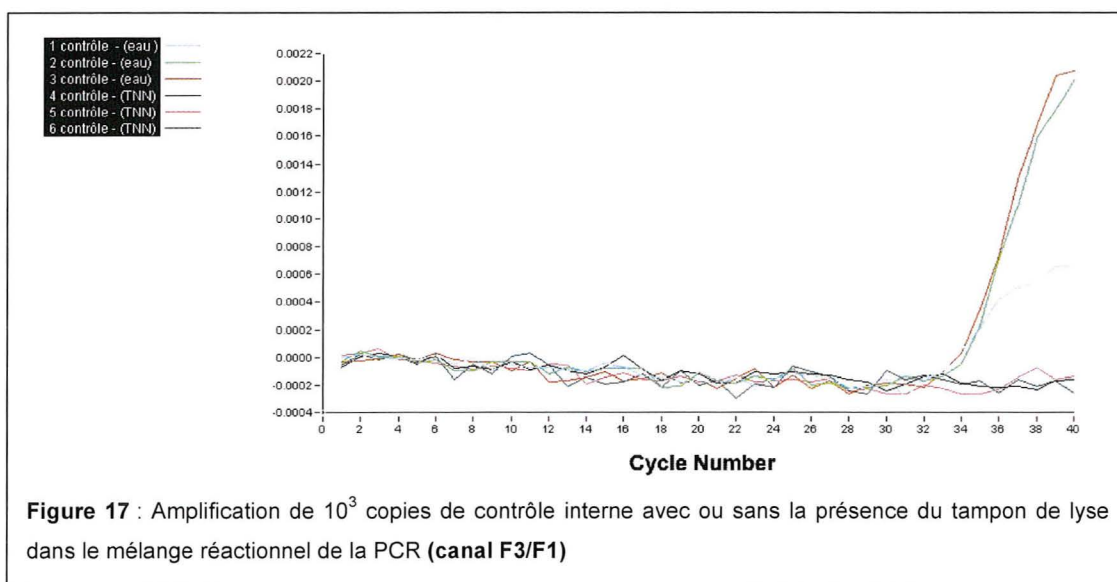


#### Choix de la méthode d'extraction

Lorsque l'extraction est réalisée par la méthode rapide, les courbes représentant la fluorescence émise par les sondes spécifiques du fragment cible de *T. gondii* ne présentent plus la partie exponentielle, or c'est cette partie qui est fondamentale pour

déterminer les Cp (figure 16). De plus, le contrôle interne ( $10^3$  copies par PCR) n'est jamais amplifié même dans le contrôle négatif.

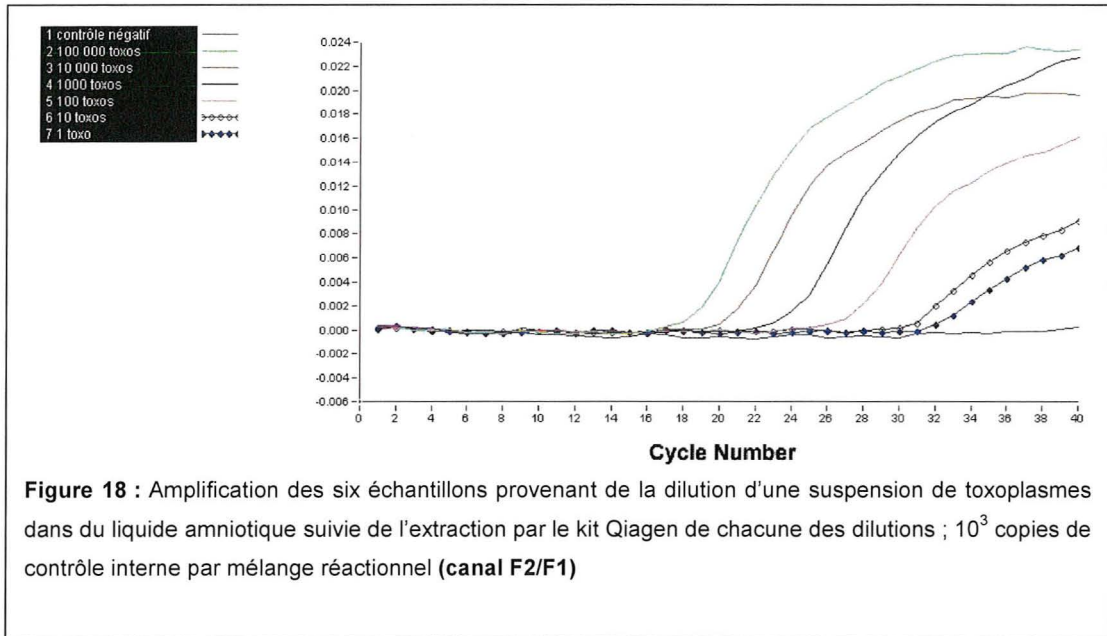
Pour préciser l'interférence de la méthode d'extraction rapide sur la détection du contrôle interne, six mélanges réactionnels sont préparés avec le contrôle interne mais sans ADN de *T. gondii*. Trois d'entre eux contiennent le tampon de lyse TNN utilisé lors de l'extraction rapide. Il n'y a pas d'amplification du contrôle interne dans les échantillons contenant le TNN alors que le contrôle interne est bien amplifié dans les trois échantillons témoins sans TNN (figure 17). Ainsi, le TNN semble interférer avec l'émission de fluorescence des sondes FRET en tandem, la méthode d'extraction rapide est donc abandonnée.



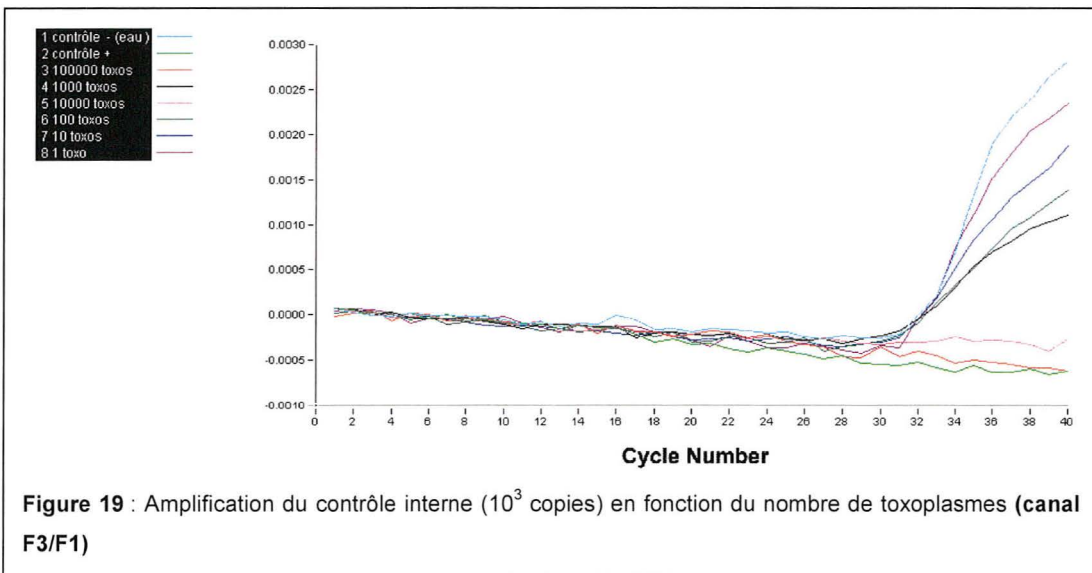
L'extraction des six échantillons constituant la gamme est alors effectuée par un kit commercial : le « QIAamp DNA Mini kit » (Qiagen)

Les six échantillons composant la gamme sont cette fois-ci tous amplifiés. Le contrôle interne ( $10^3$  copies par PCR) est détecté dans les trois échantillons les moins concentrés en tachyzoïtes (figures 18 et 19). Cette méthode d'extraction est donc retenue.

Une droite d'étalonnage est obtenue à partir des résultats de cette PCR et les paramètres la caractérisant sont calculés par le logiciel associé au LightCycler® (figure 20). Le coefficient de corrélation est 0,99 et la pente de la droite est  $-2,855$ .



**Figure 18** : Amplification des six échantillons provenant de la dilution d'une suspension de toxoplasmes dans du liquide amniotique suivie de l'extraction par le kit Qiagen de chacune des dilutions ;  $10^3$  copies de contrôle interne par mélange réactionnel (canal F2/F1)



**Figure 19** : Amplification du contrôle interne ( $10^3$  copies) en fonction du nombre de toxoplasmes (canal F3/F1)

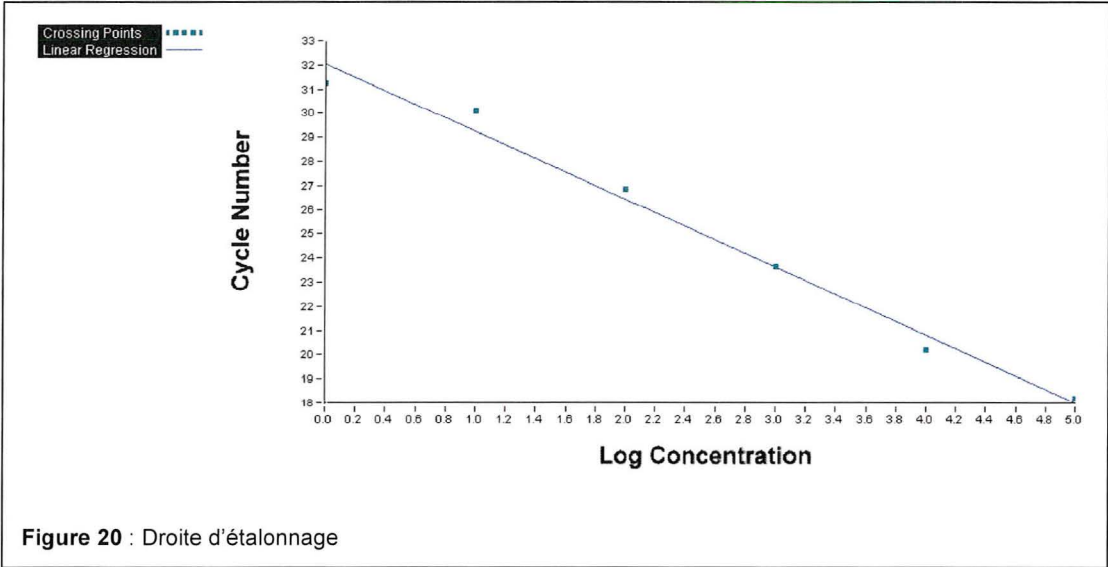


Figure 20 : Droite d'étalonnage

## 1.3 Caractéristiques de la PCR en temps réel

### 1.3.1 Caractéristiques des droites d'étalonnage

L'étalonnage est réalisé en six points (1 à  $10^5$  toxoplasmes/prise d'essai), chaque point de la gamme provient de la dilution d'une suspension de toxoplasmes dans du liquide amniotique et est extrait individuellement.

Les paramètres des droites d'étalonnage présentés dans le tableau VI permettent de valider cette technique incluant un contrôle interne ( $10^3$  copies par PCR). La reproductibilité de l'étalonnage est étudiée sur 5 séries de PCR.

PCR	Intercept*	Pente	E	r
1	32,35	-2,614	>2	0,98
2	32,14	-2,462	>2	0,98
3	32,60	-2,710	>2	0,99
4	32,13	-2,585	>2	0,98
5	32,37	-2,702	>2	0,98
<b>Moyenne</b>	<b>32,318</b>	<b>-2,615</b>		<b>0,982</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,212</b>	<b>0,172</b>		<b>0,004</b>
<b>Coefficient de variation</b>	<b>0,006</b>	<b>0,039</b>		<b>0,003</b>

*NB : intercept = point d'intersection de la droite d'étalonnage avec l'axe des ordonnées*

**Tableau VI** : Paramètres de l'étalonnage avec contrôle interne ( $10^3$  copies)

Notre PCR en temps réel permet la quantification de *T. gondii* pour une gamme de concentration allant de 1 à  $10^5$  toxoplasmes par prise d'essai PCR. La limite de quantification est un toxoplasme par PCR.

### 1.3.2 Reproductibilité de la PCR en temps réel

Le cycle seuil (Cp) est le paramètre choisi pour étudier la reproductibilité. La reproductibilité inter-essai (tableau VII) est évaluée sur des dilutions dans du liquide

amniotique d'une suspension de toxoplasmes. Chacune de ces dilutions est extraite individuellement avec le kit Qiagen et testée dans 5 PCR différentes.

La reproductibilité intra-essai (tableau VIII) est effectuée également sur 6 dilutions d'une suspension de toxoplasmes et chaque dilution est testée 5 fois dans la même réaction de PCR. Un seul échantillon n'a pas pu être analysé car le capillaire s'est cassé lors de son introduction dans le carrousel.

PCR	Crossing-point (Cp) en fonction du nombre de toxoplasmes pour 5µl de prise d'essai					
	100 000	10 000	1000	100	10	1
1	20,15	20,55	24,01	27,80	30,97	31,44
2	19,80	20,58	24,27	27,57	30,59	31,22
3	19,54	20,26	23,98	27,10	30,23	31,93
4	19,65	20,47	23,69	27,55	30,68	31,67
5	19,49	20,81	24,55	27,59	30,52	32,02
<b>Moyenne</b>	<b>19,726</b>	<b>20,534</b>	<b>24,100</b>	<b>27,522</b>	<b>30,598</b>	<b>31,656</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,265</b>	<b>0,199</b>	<b>0,325</b>	<b>0,256</b>	<b>0,268</b>	<b>0,333</b>
<b>Coefficient de variation</b>	<b>0,013</b>	<b>0,010</b>	<b>0,013</b>	<b>0,009</b>	<b>0,009</b>	<b>0,011</b>

**Tableau VII** : reproductibilité de la PCR en temps réel avec contrôle interne

PCR	Crossing-point (Cp) en fonction du nombre de toxoplasmes pour 5µl de prise d'essai					
	100 000	10 000	1000	100	10	1
1	20,20	20,57	23,34	27,26	29,54	30,86
2	19,50	20,37	23,72	27,02	30,03	30,67
3	19,00	20,18	23,52	26,88	30,17	31,00
4	20,04	20,12	23,27	26,74	30,22	31,22
5	18,88	/	23,85	27,02	30,50	30,64
<b>Moyenne</b>	<b>19,538</b>	<b>20,310</b>	<b>23,540</b>	<b>26,984</b>	<b>30,092</b>	<b>30,899</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,615</b>	<b>0,205</b>	<b>0,246</b>	<b>0,193</b>	<b>0,353</b>	<b>0,211</b>
<b>Coefficient de variation</b>	<b>0,031</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,007</b>	<b>0,012</b>	<b>0,007</b>

**Tableau VIII** : répétabilité de la PCR en temps réel avec contrôle interne

La limite de détection de la PCR en temps réel est, d'après ces résultats, de un toxoplasme par prise d'essai PCR.

### 1.3.3 Spécificité de la PCR en temps réel

Aucun des huit microorganismes testés n'est amplifié et détecté. Le contrôle interne (1000 copies par PCR) est bien amplifié dans chaque échantillon témoignant du bon déroulement de la PCR. La spécificité de la PCR en temps réel est donc 100%.

### 1.3.4 Amplification de la souche Prugniaud

Dix microlitres d'une suspension de bradyzoïtes de la souche Prugniaud (500 bradyzoïtes/ $\mu$ l) sont extraits par le kit Qiagen puis 5  $\mu$ l de l'éluat sont ajoutés au mélange réactionnel d'une PCR. L'ADN de la souche Prugniaud est bien amplifié et détecté ( $C_p = 27,2$ ) ainsi que le contrôle interne.

## 1.4 Evaluation de la PCR sur des échantillons artificiels

La limite de détection biologique est recherchée sur des prélèvements de liquide amniotique artificiellement contaminés (1, 2, 4, 5, 10 et 20 toxoplasmes/ml). Les six échantillons ont été extraits avec le kit Qiagen. Le volume final d'éluat contenant l'ADN extrait est 200  $\mu$ l.

Après extraction d'une première série de six liquides amniotiques, dix PCR sont réalisées à partir de chaque échantillon extrait ce qui équivaut à l'analyse de 50  $\mu$ l d'éluat sur 200  $\mu$ l (tableau IX).

Tachyzoïtes par ml de liquide amniotique	Nombre de PCR positives	Amplification du contrôle interne	Interprétation : nombre de PCR positives
1	3/10	9/10	3/9
2	0/10	0/10	Non interprétable
4	7/10	10/10	7/10
5	6/10	9/10	6/10
10	6/10	10/10	6/10
20	10/10	10/10	10/10

Tableau IX : limite de détection biologique en réalisant 10 PCR par échantillon extrait

Après extraction d'une deuxième série de six liquides amniotiques, trois PCR sont réalisées à partir de chaque éluat afin de se rapprocher des conditions d'analyse d'un véritable échantillon biologique de patient (tableau X).

Tachyzoïtes par ml de liquide amniotique	Nombre de PCR positives	Amplification du contrôle interne	Interprétation : nombre de PCR positives
1	1/3	2/3	1/2
2	1/3	3/3	1/3
4	0/3	3/3	0/3
5	0/3	3/3	0/3
10	3/3	3/3	3/3
20	3/3	3/3	3/3

**Tableau X** : limite de détection biologique en réalisant 3 PCR par échantillon extrait

Enfin, une troisième série de liquides amniotiques artificiellement contaminés est réalisée. Trois PCR sont effectuées sur les six échantillons extraits dont une en l'absence du contrôle interne (tableau XI).

Tachyzoïtes par ml de liquide amniotique	Nombre de PCR positives en présence du contrôle interne (correctement amplifié)	Nombre de PCR positive sans contrôle interne
1	1/2	0/1
2	0/2	0/1
4	1/2	0/1
5	1/2	0/1
10	1/2	0/1
20	1/2	0/1

**Tableau XI** : limite de détection biologique en réalisant 3 PCR par échantillon extrait dont une en l'absence du contrôle interne



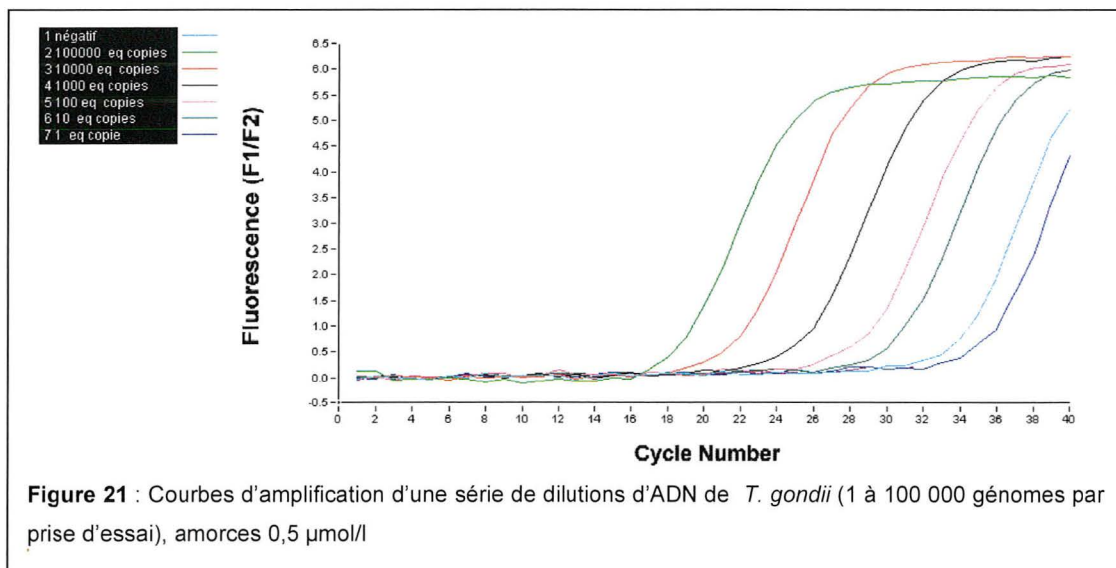
## 2. PCR en temps réel avec les amorces Tg F et Tg R

### 2.1 Détection des amplifications par le SYBR Green I

#### 2.1.1 Etalonnage à partir de dilutions d'ADN de *T. gondii*

Une série de dilutions de l'ADN est réalisée dans de l'eau stérile afin d'obtenir six échantillons contenant 1, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> génomes de *T. gondii* par prise d'essai PCR. Chaque point de la gamme est amplifié (figure 21) et la corrélation entre les cycles seuils et les concentrations en ADN est excellente :  $r = 0,99$ .

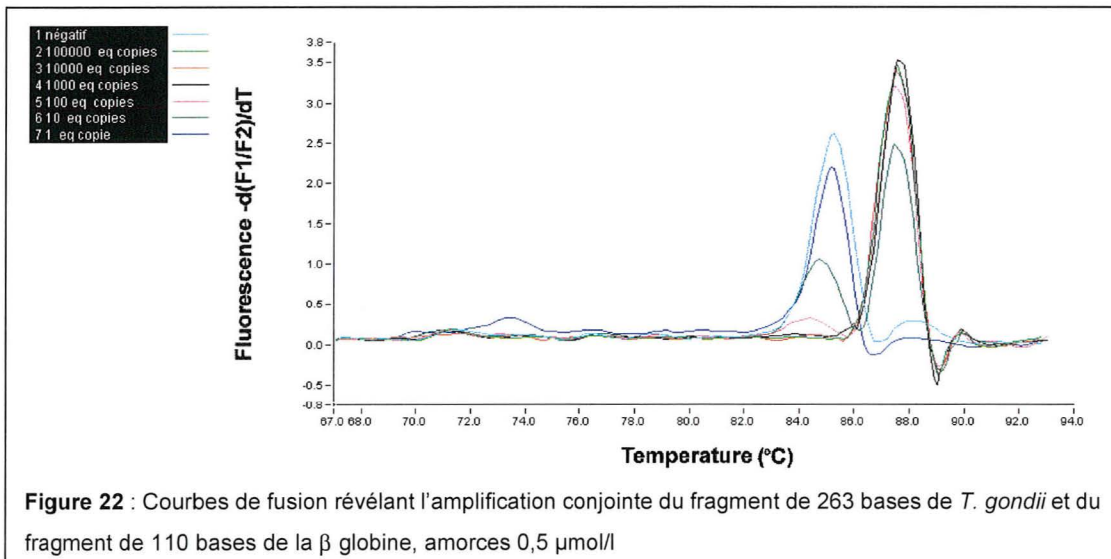
D'après la courbe de fusion réalisée en fin de PCR, il existe un phénomène de dimères d'amorces dans le contrôle négatif seulement ; ainsi la concentration en amorces ne nécessite pas d'être modifiée.



### 2.1.2 Ajout du contrôle interne : la $\beta$ globine

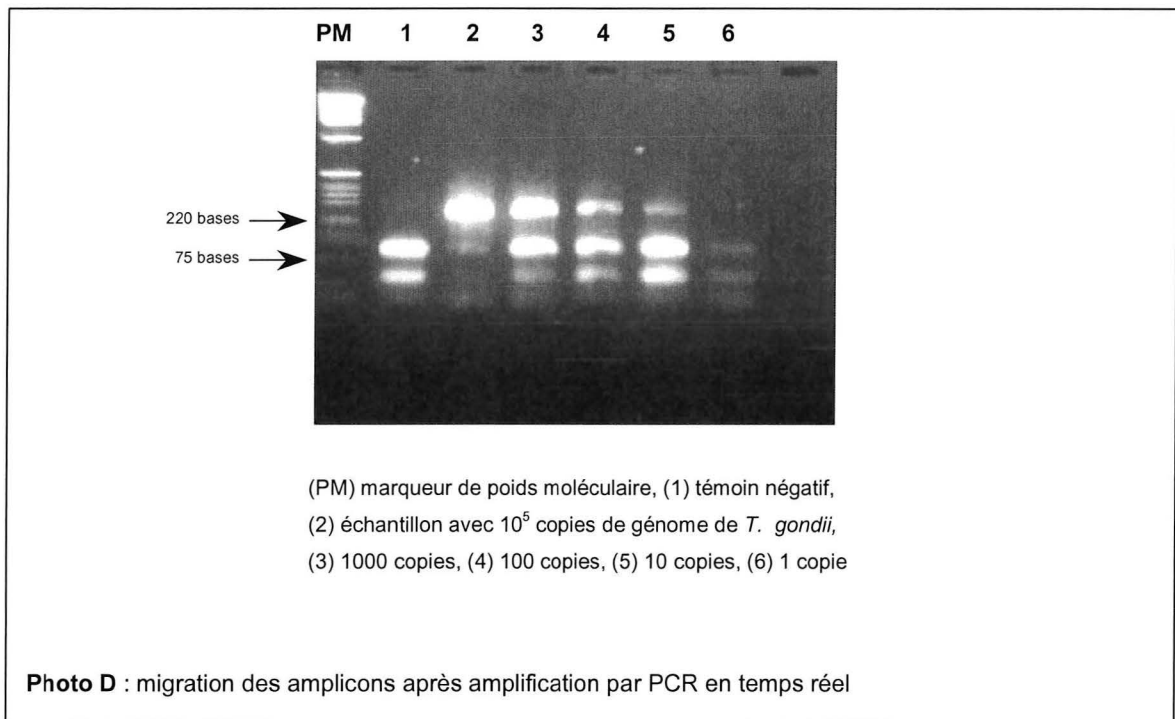
Six dilutions d'ADN de *T. gondii* sont amplifiées en présence de la  $\beta$  globine (1000 copies du gène par réaction PCR d'après les recommandations du kit). Les courbes de fusion révèlent tout d'abord que le  $T_m$  de la  $\beta$  globine (84,7°C) est suffisamment éloigné du  $T_m$  du fragment cible de *T. gondii* (87,6°C) pour pouvoir distinguer 2 pics lorsque ces 2 fragments sont amplifiés ensemble dans un même échantillon (figure 22).

Ces courbes montrent également que l'ADN de *T. gondii* est amplifié dans chaque échantillon sauf celui dont la concentration en ADN correspond à un parasite par prise d'essai. La  $\beta$  globine est amplifiée dans l'échantillon servant de témoin négatif et dans les échantillons dont la concentration en ADN correspond à 1, 10 et 100 parasites par prise d'essai.



La taille attendue des amplicons est ensuite vérifiée après migration des produits PCR sur gel d'agarose (photo D).

Les conditions d'amplifications apparaissent adaptées et le travail est poursuivi avec la détection par les sondes FRET en tandem.



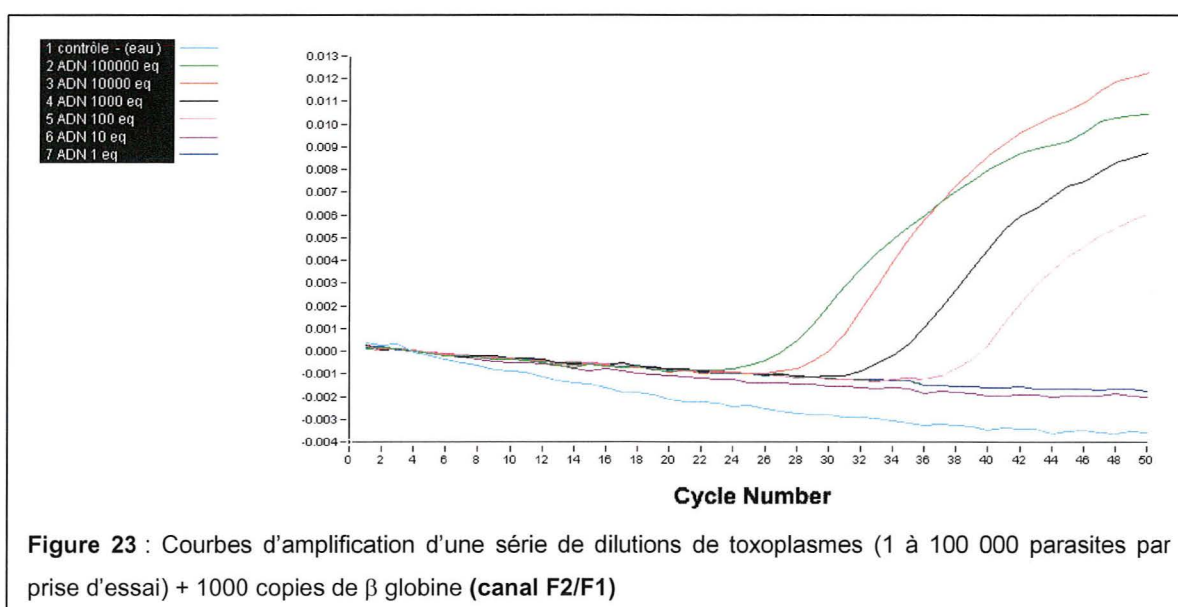
## 2.2 Détection des amplifications par les sondes FRET en tandem

### 2.2.1 Mise au point de la droite d'étalonnage à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes

Six échantillons provenant d'une série de dilutions dans du liquide amniotique d'une suspension de toxoplasmes sont extraits par le kit Qiagen puis amplifiés en présence de  $\beta$  globine (1 à  $10^5$  toxoplasmes par prise d'essai).

L'ADN de *T. gondii* n'est pas amplifié dans les échantillons contenant respectivement 1 et 10 toxoplasmes par prise d'essai. De plus, l'ajout de 10 cycles supplémentaires est nécessaire pour amplifier les 4 autres échantillons (figure 23).

La  $\beta$  globine est amplifiée dans les échantillons avec 1, 10, 100 et 1000 toxoplasmes par prise d'essai mais là encore, les Cp sont tardifs (autour de 41 cycles) et la réalisation de 50 cycles de PCR est nécessaire pour les calculer. Les conditions d'amplification doivent donc être améliorées et pour cela le contrôle interne est éliminé provisoirement.



### 2.2.2 Etalonnage sans la $\beta$ globine

Les mêmes échantillons sont à nouveau amplifiés en l'absence de  $\beta$  globine pour s'affranchir d'une éventuelle interférence du contrôle interne.

Ils sont également amplifiés (en l'absence de contrôle interne) dans une autre PCR, par les mêmes amorces, mais avec une détection des amplifications par le SYBR Green I. Les valeurs des Cp se rapportant à chaque système de détection sont présentées dans le tableau XII et peuvent être comparées. Le tableau XII rappelle également les valeurs des Cp trouvées lors de l'amplification de *T. gondii* par les amorces JW 58 et JW 59.

Toxoplasmes par prise d'essai	Valeur des Crossing Points (Cp)			
	Sondes FRET TgR / TgF	SYBR Green I TgR / TGF	Sondes FRET JW58 / JW59	SYBR Green I JW58 / JW59
10 <sup>5</sup>	23,90	18,24	19,00	12,75
10 <sup>4</sup>	31,85	21,75	20,18	17,02
10 <sup>3</sup>	>36	25,53	23,52	20,79
10 <sup>2</sup>	/	28,85	26,88	23,96
10	/	30,49	30,17	28,22
1	/	/	31,00	30,90

**Tableau XII** : Comparaison des Cp

Le système associant les amorces Tg F et Tg R et le couple de sondes FRET en tandem, système pour la première fois étudié, ne permet pas d'établir un étalonnage avec de telles conditions d'amplification et/ou détection. Mais, la concentration des amorces et les caractéristiques de l'amplification (durée et température) sont bien adaptées à la vue des résultats obtenus avec le SYBR Green I (tableau XII). Il convient alors d'optimiser la phase de détection par les sondes FRET en tandem.

### 2.2.3 Optimisation de la concentration des sondes FRET

Trois concentrations de sondes sont testées (0,25 ; 0,3 et 0,4 µmol/l) afin d'améliorer la détection des amplifications mais les Cp restent toujours tardifs et les échantillons avec 1, 10, 100 et 1000 toxoplasmes par prise d'essai ne sont pas détectés.

### 2.2.4 Optimisation de la température d'hybridation

De nouvelles températures d'hybridation sont testées pour améliorer l'appariement des sondes sur leur séquence complémentaire. Là encore, les échantillons avec 1, 10, 100 et 1000 toxoplasmes par prise d'essai ne sont pas détectés et les échantillons avec 10<sup>5</sup> et 10<sup>4</sup> toxoplasmes par prise d'essai nécessitent 50 cycles afin d'être amplifiés et détectés.

La limite de détection de la RT-PCR amplifiant le gène de 529 bases est donc 1000 toxoplasmes par prise d'essai. La mise au point n'est que partielle et il conviendrait de poursuivre ce travail avec un nouveau couple amorces/sondes.

---

# Discussion

La toxoplasmose pose encore aujourd'hui un important problème de santé publique. En effet, la primo-infection toxoplasmique au cours de la grossesse expose au risque d'atteinte foétale par passage transplacentaire du parasite. De plus, la réactivation des kystes de *T. gondii* complique les suites d'une greffe de moelle osseuse ou d'une chimiothérapie. Enfin, la toxoplasmose cérébrale demeure toujours une des infections opportunistes fréquentes et potentiellement mortelles des sujets atteints par le VIH.

Fréquente et grave (un à deux cas pour 1000 naissances), la toxoplasmose congénitale justifie en France une prévention s'appuyant sur des dispositions légales ce qui permet de dépister le plus tôt possible une séroconversion pergravidique (Ambroise-Thomas *et al*, 2001). Lors d'une contamination survenant au cours d'une grossesse, la recherche d'une atteinte foétale par diagnostic anténatal sur liquide amniotique est fondamentale car elle conditionne l'instauration d'un traitement spécifique et adapté prévenant les séquelles foétales (Foulon *et al*, 1999 ; Hohlfeld *et al*, 1989).

Les méthodes classiques de mise en évidence du parasite dans le liquide amniotique, l'inoculation à la souris et la culture sur cellules, manquent de sensibilité et de plus, le délai de la réponse à l'examen est long (plusieurs semaines). Les progrès réalisés en matière de biologie moléculaire ont permis de développer des techniques de PCR sensibles et spécifiques qui participent à l'établissement d'un diagnostic anténatal rapide et précoce (Bastien, 2002).

Plus récemment, la littérature souligne l'intérêt de la PCR en temps réel pour le diagnostic de nombreuses pathologies infectieuses (Klein, 2002). Les atouts de cette nouvelle technologie sont multiples : rapidité, spécificité, sensibilité, suppression des étapes post-PCR et quantification de l'ADN. Actuellement, il existe huit protocoles de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *T. gondii*. Plusieurs gènes cibles sont amplifiés : le gène B1 (Buchbinder *et al*, 2003 ; Costa *et al*, 2000 ; Lin *et al*, 2000 ; Romand *et al*, 2004), le gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal (Jauregui *et al*, 2001 ; Kupferschmidt *et al*, 2001), le gène codant pour la protéine P30 (Buchbinder *et al*, 2003) et le gène de 529 bases répété 200 à 300 fois dans le génome de *T. gondii* (Reischl *et al*, 2003). Ces protocoles permettent la quantification de l'ADN parasitaire pour une gamme de concentration étendue. La limite de quantification se situe autour d'un équivalent génome par prise d'essai, et elle est même parfois plus basse (Costa *et al*, 2000 ; Lin *et al*, 2000). Nous pouvons regretter cependant que ces limites soient rapportées à un volume de prise d'essai et non pas au volume initial de l'échantillon à analyser.

Plusieurs études cliniques ont été réalisées à partir de ces protocoles afin de préciser l'intérêt de quantifier l'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique lors de toxoplasmose congénitale et dans le sang ou le LCR lors de toxoplasmose chez un patient immunodéprimé. L'analyse de l'évolution de la charge parasitaire chez un patient

immunodéprimé permettrait de savoir si celui-ci présente un risque de développer une toxoplasmose clinique sévère (Costa *et al*, 2000 ; Martino *et al*, 2005). De plus, le suivi de la charge parasitaire serait également corrélé à l'efficacité du traitement instauré (Menotti *et al*, 2003). En ce qui concerne la toxoplasmose congénitale, seulement trois équipes ont travaillé sur la signification de la charge parasitaire dans le liquide amniotique. Les deux premières études semblent conclure à une corrélation entre la charge parasitaire dans le liquide amniotique et l'importance de l'atteinte fœtale (Costa *et al*, 2001 ; Romand *et al*, 2004) alors que la troisième étude réfute cette hypothèse (Ordinaire *et al*, 2005).

Nous avons choisi d'adapter une PCR classique utilisée depuis plusieurs années dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble afin de mettre au point une PCR en temps réel. Cette PCR classique amplifie le gène B1 répété 35 fois dans le génome du parasite grâce à deux amorces, JW 58 et JW 59, et possède l'avantage de fonctionner avec un véritable contrôle interne. Ce contrôle interne est un plasmide possédant dans sa séquence un fragment qui est amplifié par les amorces JW 58 et JW 59. La révélation des amplicons s'effectue par une migration sur gel d'agarose et également par hybridation sur plaque à l'aide d'une sonde nucléotidique marquée à la digoxigénine. Cette PCR permet la détection d'un génome de *T. gondii* (Pelloux *et al*, 1996).

La découverte récente d'un gène de 529 bases répété 200 à 300 fois chez *T. gondii* (Homan *et al*, 2000) a permis d'obtenir un gain en sensibilité. Les PCR amplifiant ce gène détectent jusqu'à l'équivalent de 0,2 génome parasite (Filisetti *et al*, 2003 ; Reischl *et al*, 2003). Pour cette raison, il a été décidé de mettre au point en parallèle une deuxième technique de PCR en temps réel amplifiant un fragment de ce nouveau gène de 529 bases.

Les PCR en temps réel ont été effectuées sur l'appareil LightCycler® (Roche Diagnostics). Dans un premier temps, certains paramètres techniques ont été optimisés en se servant d'un système de détection basé sur une molécule fluorescente, le SYBR Green I. Puis, dans un deuxième temps, l'évaluation des caractéristiques des deux PCR a été effectuée en utilisant des sondes d'hybridation fluorescentes FRET en tandem comme moyen de détection des amplifications. En effet, plusieurs travaux ont montré que les PCR utilisant des sondes d'hybridation sont plus spécifiques et plus sensibles que les PCR associées au SYBR Green I du fait de l'association de la spécificité des séquences nucléotidiques des sondes à celle des amorces, et ceci notamment en présence d'ADN humain (Belleste *et al*, 2003 ; Edvinsson *et al*, 2004).



Nous avons décidé d'inclure dans chacun des deux protocoles un contrôle interne. En effet, la présence dans les réactions de PCR d'un véritable contrôle interne, c'est à dire amplifié par les mêmes amorces que le fragment cible, est nécessaire afin de bien repérer d'éventuels faux négatifs dus à un problème technique ou à la présence d'inhibiteurs de PCR (Hoorfar *et al*, 2004). A ce jour, aucun protocole de PCR en temps réel appliqué au diagnostic de la toxoplasmose et incluant un véritable contrôle interne n'a été décrit dans la littérature. Beaucoup de protocoles ne possèdent aucun contrôle interne et les quelques équipes travaillant avec un contrôle interne utilisent en fait un gène de souris que nous pouvons qualifier de contrôle interne externe (Costa *et al*, 2001 ; Hierl *et al*, 2004 ; Jauregui *et al*, 2001).

Pour pouvoir conserver dans notre protocole de PCR en temps réel le contrôle interne dont la synthèse est décrite par Pelloux et al (Pelloux *et al*, 1996), il a été nécessaire de concevoir deux couples de sondes. Leurs séquences ont été déterminées de manière à obtenir une hybridation hautement spécifique du premier couple de sondes sur le fragment cible du gène B1, et une hybridation également très spécifique du deuxième couple de sondes sur le contrôle interne tout en respectant d'autres contraintes comme la température d'appariement, le nombre de nucléotides entre les sondes une fois hybridées. La société Proligo® a réalisé pour nous la conception de ces deux couples de sondes à partir de la séquence cible du gène B1, de la séquence du plasmide et enfin de la séquence des amorces JW 58 et JW 59.

Le gène de la  $\beta$  globine a été utilisé pour servir de contrôle interne à la PCR amplifiant le gène de 529 bases. Nous avons utilisé un kit commercial adapté au LightCycler® nous fournissant le gène de la  $\beta$  globine, les amorces qui l'amplifient ainsi que deux sondes d'hybridation en tandem.

Pour améliorer la spécificité des méthodes de PCR, des procédures « hot start » sont décrites dans la littérature afin de réduire la formation de produits d'amplification non spécifiques (Kaboev *et al*, 2000). Nous avons choisi de travailler avec une Taq polymérase modifiée chimiquement qui est inactive à température ambiante et retrouve son activité après une incubation à 95°C. De plus, la présence d'UNG dans chaque mélange réactionnel permet de dégrader d'éventuels amplicons contaminants (Burkardt, 2000 ; Rys *et al*, 1993 ; Taggart *et al*, 2002). L'association de ces deux procédés permet habituellement de réduire la présence d'amplifications non spécifiques et de faux-positifs.

## PCR en temps réel amplifiant le gène B1

L'optimisation des paramètres de la PCR a été effectuée avec le SYBR Green I comme agent de détection des amplifications. Tout d'abord, différentes concentrations d'amorces ont été comparées (0,5 ; 0,4 ; 0,3 et 0,25  $\mu\text{mol/l}$ ) et la concentration de 0,5  $\mu\text{mol/l}$  a été retenue, concentration avec laquelle les amplifications sont optimales.

Le passage à un système de détection par des sondes FRET en tandem a ensuite nécessité l'optimisation de la température d'hybridation de la PCR. En effet, d'après le protocole de la PCR conventionnelle, cette température est fixée à 70°C. Or, pour travailler avec des sondes en tandem, il faut que la température d'appariement des sondes soit 5°C plus élevée que la température de l'étape d'hybridation de la PCR. Si celle-ci reste à 70°C, il faut alors concevoir deux sondes avec une température d'appariement de 75°C, ce qui est techniquement impossible. Plusieurs températures d'hybridation ont donc été testées : 65°C, 62°C, 60°C et 55°C. La température d'hybridation retenue est 62°C ; en effet, à cette température là, l'hybridation des amorces reste spécifique, contrairement à ce qui se passe pour des températures de 55°C ou 60°C.

Une fois les différents paramètres optimisés, les caractéristiques de la PCR en temps réel ont été évaluées en utilisant les sondes FRET en tandem. En effet, il est possible d'établir une droite d'étalonnage avec le SYBR Green I mais cela suppose l'abandon du contrôle interne puisque la fluorescence due à l'amplification du gène B1 de *T. gondii* ne peut être distinguée de celle due à l'amplification du contrôle interne. Or la présence d'un contrôle interne nous semble indispensable. Une seule équipe a mis au point une PCR en temps réel avec le SYBR Green I pour la quantification de *T. gondii* (Romand *et al*, 2004). Il n'y pas de contrôle interne dans cette PCR et l'auteur conclut à la nécessité d'évoluer vers une RT-PCR associée à une détection par des sondes fluorescentes.

Le nombre de copies de contrôle interne à ajouter par réaction PCR a été déterminé en amplifiant une large gamme de concentration en ADN de *T. gondii* (1 à  $10^5$  génomes par prise d'essai) en présence de  $10^2$ ,  $10^3$  ou  $10^5$  copies du plasmide. Comme ce sont les mêmes amorces qui amplifient le contrôle interne et l'ADN de *T. gondii*, une compétition entre ces deux fragments pourrait se créer pour l'hybridation des amorces. Aussi, il est nécessaire de trouver un équilibre permettant d'amplifier le gène B1 quelle que soit sa concentration tout en plaçant un nombre de copies de contrôle interne suffisamment important pour que celui-ci puisse être amplifié correctement dans les échantillons négatifs. Lorsque le nombre de copies est fixé à  $10^3$  par mélange réactionnel, l'ADN de *T. gondii* est

toujours amplifié en présence du contrôle interne même lorsque sa concentration est basse (1 génome par prise d'essai) et le contrôle interne est détecté dans les contrôles négatifs et dans les échantillons contenant 1, 10 et 100 génomes de *T. gondii* par prise d'essai. Nous avons décidé de conserver cette valeur de  $10^3$  copies de contrôle interne par PCR car il ne nous paraît pas nécessaire que ce dernier soit détecté lorsque l'ADN parasitaire se trouve en quantité importante.

Pour établir les droites d'étalonnage, nous avons choisi de réaliser des dilutions dans du liquide amniotique d'une suspension de toxoplasmes suivies de l'extraction individuelle de chaque échantillon dilué. La plupart des équipes utilisent des dilutions d'ADN de *T. gondii* pour réaliser l'étalonnage en faisant abstraction de l'étape d'extraction de l'ADN. Il nous paraît cependant fondamental de s'approcher le plus possible des conditions relatives à l'analyse d'un échantillon biologique. L'étape de l'extraction de l'ADN est donc fondamentale et a une répercussion directe sur l'établissement de la droite d'étalonnage. La méthode d'extraction choisie doit être performante et compatible avec la détection par les sondes FRET en tandem. Nous n'avons pas utilisé la méthode d'extraction classique (phénol/chloroforme) pour obtenir les échantillons de la gamme d'étalonnage car cette méthode utilise du phénol qui a une fluorescence propre. La moindre quantité de phénol restant dans l'extrait d'ADN risquerait donc d'interférer sur la fluorescence des sondes FRET en tandem.

Nous avons donc décidé d'extraire les échantillons constituant la gamme d'étalonnage par la méthode rapide utilisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie. Mais, l'analyse des courbes d'amplification révèle que celles représentant l'amplification du gène B1 s'éloignent du modèle théorique vers lequel elles devraient tendre : ces courbes ne présentent plus la partie exponentielle qui permet de calculer les Cp. De plus, le contrôle interne n'est plus détecté lorsqu'il y a dans le milieu réactionnel le tampon de lyse. Ce tampon de lyse contient en particulier du TNN (éthylphényl-polyéthylène glycol) et de la soude. Une interférence du TNN sur l'émission de la fluorescence des sondes peut être envisagée mais cela n'explique pas pourquoi la migration sur gel des produits amplifiés ne révèle aucune amplification du contrôle interne. Le TNN pourrait peut être influencer l'étape même d'amplification tout en sachant que cette interférence là ne se produit pas en PCR classique. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature l'explication de cette interférence. Cette méthode d'extraction a donc été abandonnée bien qu'elle présente plusieurs avantages : simplicité, rapidité, faible volume d'extrait d'ADN (50  $\mu$ l) et faible coût.

L'extraction des échantillons constituant la gamme d'étalonnage a donc dû être réalisée par une autre méthode : nous avons utilisé un kit commercial (QIAamp DNA mini kit de Qiagen) qui extrait puis purifie les acides nucléiques grâce à une membrane de silice à

l'intérieur de mini colonnes de centrifugation. Cette technique est associée à un volume d'élution de l'ADN important (200 µl), néanmoins elle est utilisée dans de nombreux protocoles de RT-PCR (Edvinsson *et al*, 2004 ; Menotti *et al*, 2003 ; Simon *et al*, 2004). Cette méthode s'est révélée tout à fait adaptée à notre travail et une droite d'étalonnage est obtenue après extraction individuelle des six échantillons (1 à 10<sup>5</sup> toxoplasmes par prise d'essai).

Le coefficient de corrélation de notre droite d'étalonnage est 0,982 (moyenne sur cinq droites d'étalonnage). Il n'est pas possible de comparer cette valeur avec les données de la littérature car, à ce jour, aucun autre modèle appliqué au liquide amniotique et incluant un contrôle interne n'a été étudié. Le travail de Kupferschmidt *et al* est celui qui se rapproche le plus du nôtre : l'étalonnage est réalisé à partir de 4 échantillons de liquide amniotique extraits individuellement ( $r^2=0.9258$ ) mais la détection des amplifications est effectuée grâce à une sonde d'hydrolyse Taqman® et il n'y a pas de contrôle interne (Kupferschmidt *et al*, 2001). D'autres travaux présentent des coefficients de corrélation proche de un mais la droite d'étalonnage a été obtenue par des dilutions d'ADN de *T. gondii* et il n'y a pas de contrôle interne (Costa *et al*, 2000 ; Jauregui *et al*, 2001 ; Lin *et al*, 2000). La valeur de notre coefficient de corrélation est cependant très satisfaisante car elle prend en compte l'étape d'extraction de l'ADN et l'étape d'amplification. Nous avons réalisé quelques droites d'étalonnage à partir de dilutions d'ADN dans de l'eau stérile afin de préciser l'influence de l'extraction sur l'établissement des droites d'étalonnage. Les droites d'étalonnage réalisées à partir d'une dilution d'ADN possèdent un coefficient de corrélation légèrement plus élevé ( $r=0.997$ ). Nous pouvons supposer que c'est l'extraction individuelle des six échantillons qui permet d'expliquer cette faible différence.

La réalisation de cinq droites d'étalonnage nous a permis de valider la reproductibilité de notre étalonnage (les coefficients de variation de la pente et de l'intercept sont respectivement 3,9% et 0,6%). Par ailleurs, nous constatons que la pente de nos droites (-2,615 en moyenne) s'éloigne de la valeur théorique fixée à -3,3. En effet, l'échantillon avec 10<sup>5</sup> toxoplasmes par prise d'essai est toujours associé à un Cp relativement tardif par rapport au deuxième point de notre gamme (19,7 cycles pour le premier point de la gamme et 20,5 cycles pour le second). Il devrait se trouver 3,3 cycles avant le Cp du point suivant ce qui n'est pas le cas. En conséquence, la valeur de la pente est inférieure à ce qu'elle devrait être en théorie et ainsi le calcul de l'efficacité d'amplification E, qui prend en compte la pente, est surestimé et est supérieur à deux.

La limite de quantification de notre RT-PCR est un toxoplasme par prise d'essai ; elle est comparable à celles trouvées par les autres équipes qui amplifient le gène B1 (Buchbinder *et al*, 2003 ; Costa *et al*, 2000) même si certaines obtiennent des limites de quantification inférieures : 0,75 ou 0,05 équivalent génome par prise d'essai (Costa *et al*,

2000; Lin *et al*, 2000). En effet, les droites d'étalonnage de ces équipes sont réalisées à partir de dilutions d'ADN et il est possible en théorie d'obtenir des échantillons avec moins d'un génome de *T. gondii*. Par contre, nous travaillons avec des dilutions d'une suspension de toxoplasmes et nous ne pouvons pas obtenir des échantillons avec moins d'un toxoplasme. Cependant, il nous semble nécessaire d'exprimer notre limite de quantification par rapport au volume d'échantillon biologique et non pas par rapport au volume de prise d'essai, ce qui est cependant le cas dans toutes les études décrites dans la littérature. Il existe un facteur 40 entre le volume de notre prise d'essai (5 µl) et le volume d'ADN extrait (200 µl) ; ainsi notre limite de quantification devient 40 toxoplasmes pour 200 µl d'ADN extrait. Or ces 200 µl d'ADN sont obtenus dans notre étude à partir d'un millilitre de liquide amniotique : la limite de quantification est donc 40 toxoplasmes/ml de liquide amniotique. A ce jour, seuls Kupferschmidt *et al* ont appliqué ce raisonnement pour préciser leur limite de quantification ; leur limite est 10 toxoplasmes/ml de liquide amniotique (la prise d'essai est 25 µl). La réduction du volume d'échantillon d'ADN extrait (200 µl dans cette étude) ou l'augmentation de notre volume de prise d'essai sont des solutions à envisager pour diminuer notre limite de quantification.

Les résultats de l'étude de la reproductibilité inter et intra-essai sont intéressants car ils révèlent que notre technique est aussi reproductible pour les faibles concentrations en toxoplasmes que pour les concentrations très importantes (les CV inter-essai des Cp des échantillons avec un toxoplasme par prise d'essai et 10<sup>5</sup> toxoplasmes par prise d'essai sont respectivement 1,1% et 1,3%). En revanche, les autres publications annoncent des Cp avec des CV très importants pour les concentrations basses en parasite. Par exemple, une équipe présente des Cp avec des CV inter-essai de 12,3 %, 13,8% et 36% pour des concentrations de 100, 10 et 1 parasite par prise d'essai respectivement (Costa *et al*, 2000). Dans une autre étude, le Cp d'un échantillon avec 100 parasites par prise d'essai est associé à un CV inter-essai de 4,5% alors que le nôtre est associé à un CV inter-essai de 0,9%. Là encore, la comparaison est difficile puisque les conditions opératoires sont très différentes : les études de reproductibilité décrites consistent à diluer de l'ADN dans de l'eau stérile ou dans un milieu qui n'est jamais précisé alors que notre travail s'applique à un milieu biologique. Nous pouvons tout de même conclure à une très bonne reproductibilité de notre PCR en temps réel.

La spécificité de la PCR en temps réel a été évaluée sur des microorganismes pouvant potentiellement provoquer une infection materno-foetale (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *CMV*, *HSV*), sur d'autres protozoaires (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum*), sur une levure (*Candida albicans*) et sur un champignon

filamenteux (*Aspergillus fumigatus*). Aucun des microorganismes cités n'a été amplifié tandis que l'amplification du contrôle interne témoigne du bon déroulement de la PCR. De plus, comme l'évaluation des caractéristiques techniques de la RT-PCR a été effectuée à partir de toxoplasmes appartenant à la souche RH, nous avons vérifié que le protocole mis au point pouvait amplifier une autre souche de *T. gondii*. Pour cela, nous avons obtenu des bradyzoïtes de la souche Prugniaud. L'ADN extrait à partir de ces bradyzoïtes a bien été amplifié en présence du contrôle interne.

Après avoir recherché les caractéristiques de la RT-PCR, nous avons évalué celle-ci sur un modèle expérimental d'échantillons de liquide amniotique artificiellement contaminés. Ainsi nous avons préparé, à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes, plusieurs échantillons de liquide amniotique avec des concentrations de 1, 2, 4, 5, 10 et 20 toxoplasmes/ml (il n'a pas été possible de compter en cellule de Malassez le nombre exact de toxoplasmes présents dans chaque échantillon). Ces échantillons nous ont permis de préciser la limite de détection biologique. En effet, il est nécessaire de se rapprocher le plus possible des conditions appliquées en pratique à l'analyse d'un liquide amniotique pour définir cette limite. Nous ne pouvons nous satisfaire de rendre une limite de détection technique c'est à dire se rapportant seulement à la prise d'essai de la PCR.

Comme le volume de l'échantillon d'ADN obtenu après extraction par le kit Qiagen est largement supérieur au volume de la prise d'essai de la PCR (200  $\mu$ l et 5  $\mu$ l respectivement), dix PCR ont été réalisées sur les six échantillons de liquide amniotique afin d'étudier un maximum d'éluat. L'échantillon à 20 toxoplasmes/ml est le seul à être amplifié à chaque PCR (10 fois sur 10) alors que les autres ne le sont pas toujours (3 à 7 fois sur 10).

Actuellement, au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble, trois PCR sont réalisées sur chaque échantillon de liquide amniotique. Nous avons donc décidé de réaliser seulement trois PCR à partir de deux autres séries d'échantillons de liquide amniotique artificiellement contaminés. Lors de l'analyse de la première série, les échantillons avec 10 et 20 toxoplasmes/ml sont amplifiés trois fois sur trois tandis que les échantillons avec 1 et 2 toxoplasmes/ml sont amplifiés une fois sur trois (les échantillons avec 4 et 5 toxoplasmes/ml ne sont pas amplifiés).

Puis, nous avons réalisé trois PCR sur chacun des échantillons constituant la dernière série de liquide amniotique artificiellement contaminé dont une en l'absence du contrôle interne. En effet, comme en théorie il pourrait exister une compétition pour l'hybridation des amorces entre l'ADN de *T. gondii* et les 1000 copies de contrôle interne, l'absence de ce dernier pourrait améliorer l'amplification des faibles concentrations de *T. gondii*. Nos résultats n'ont pas confirmé cette hypothèse puisque aucune PCR réalisée en l'absence du contrôle interne n'a été positive. Au total, tous les échantillons de cette série

sont amplifiés une fois sur trois sauf l'échantillon avec 2 toxoplasmes/ml qui n'est pas amplifié au cours des trois PCR.

Comme l'écart de volume entre la prise d'essai PCR et le volume d'élution de l'ADN extrait est très important, il paraît normal que toutes les PCR ne soient pas positives puisque statistiquement il ne peut y avoir une copie du gène B1 dans chaque prise d'essai. Malgré cela, si trois PCR sont réalisées sur chaque échantillon d'ADN extrait, notre limite de détection biologique est de un toxoplasme/ml.

Il est important de comparer notre limite avec celle de la PCR conventionnelle et des autres PCR en temps réel. En utilisant des dilutions d'ADN purifié, la PCR décrite par Pelloux et al détecte un génome de *T. gondii* et la limite de détection passe à 10 génomes par prise d'essai en présence d'ADN humain (Pelloux *et al*, 1996). En ce qui concerne les PCR en temps réel, la grande majorité des auteurs ne précisent qu'une limite de détection technique, c'est à dire se rapportant au volume de la prise d'essai PCR. Dans la littérature, nous trouvons ainsi des limites de 10 (Buchbinder *et al*, 2003); 0,25 (Reischl *et al*, 2003); 0,05 (Lin *et al*, 2000); 1 (Jauregui *et al*, 2001) ou 0,75 génomes de *T. gondii* par prise d'essai (Costa *et al*, 2000). Kupferschmidt et al amplifient 2 toxoplasmes présents dans 200µl de sang et comme ils n'amplifient que 25 µl d'ADN extrait sur 200 µl d'éluat, ils extrapolent leur limite de détection à 0.25 toxoplasmes pour 200 µl de sang (Kupferschmidt *et al*, 2001). Cependant, ce raisonnement ne nous semble pas correct. Il est par conséquent très difficile de comparer tous ces résultats entre eux car notre limite de détection s'exprime en toxoplasme/ml de liquide amniotique tandis que les limites de détection présentées dans la littérature s'expriment en génome de *T. gondii* (ou équivalent parasite) par prise d'essai.

En résumé, nous avons développé une PCR en temps réel avec contrôle interne utilisant des sondes FRET en tandem pour détecter les amplifications. Cette technique quantitative se révèle reproductible, spécifique (spécificité de 100%), sensible (limite de détection de un toxoplasme/ml de liquide amniotique) et elle est adaptée à la détection de *T. gondii* dans le liquide amniotique.

## PCR en temps réel amplifiant le gène de 529 bases

La découverte d'un gène de 529 bases répété plus de 200 fois a permis la mise au point d'une PCR conventionnelle très sensible par Homan et al (Homan *et al*, 2000). Cette PCR permet la détection de 5 fg d'ADN de *T. gondii* (soit l'équivalent de 0,05 parasite). Actuellement, un seul protocole de RT-PCR amplifiant ce gène a été décrit ; cette PCR utilise un couple d'amorces différent de celui de Homan et al et permet l'amplification de 20 fg d'ADN de *T. gondii* (soit l'équivalent de 0,2 parasite) (Reischl *et al*, 2003). Nous avons donc décidé de mettre au point un deuxième protocole de RT-PCR amplifiant ce gène multicopie. Pour cela, nous avons demandé à la société Proligo® la conception de deux sondes FRET en tandem pouvant fonctionner avec les amorces décrites par Homan et al. Mais, il n'a pas été possible de concevoir de telles sondes. La société Proligo® nous a alors proposé un nouveau système amorces/sondes amplifiant et détectant une séquence de 263 bases à l'intérieur du gène cible de 529 bases (amorces nommées Tg F et Tg R). Un tel système n'a jamais été étudié jusqu'à présent. Notre protocole inclut un contrôle interne-externe, le gène de la  $\beta$  globine (1000 copies par réaction PCR sont ajoutées au moment de la préparation du mélange réactionnel).

La détection des amplifications a tout d'abord été réalisée par le SYBR Green I. Les amorces Tg F et Tg R permettent l'amplification d'une large gamme de concentration d'ADN de *T. gondii* (1 à  $10^5$  génomes par prise d'essai PCR). En présence de 1000 copies du gène de la  $\beta$  globine, les mêmes échantillons sont également amplifiés. Nous avons donc poursuivi ce travail en conservant 1000 copies du gène de la  $\beta$  globine par PCR.

Afin d'évoluer vers une RT-PCR permettant la quantification de *T. gondii* en présence d'un contrôle interne, nous avons introduit les sondes FRET en tandem. Le système est devenu complexe avec deux couples d'amorces et deux couples de sondes. Les six échantillons de liquide amniotique constituant la gamme d'étalonnage ayant servis à l'étude de la RT-PCR fonctionnant avec les amorces JW 58 et JW 59 ont été à nouveau utilisés. Les deux derniers points de la gamme (échantillons à 10 et 1 toxoplasme par prise d'essai) n'ont pas été amplifiés ( $\beta$  globine détectée). Nous avons alors décidé d'éliminer provisoirement le contrôle interne et d'analyser à nouveau ces mêmes échantillons en détectant les amplifications soit par les sondes en tandem soit par le SYBR Green I. Avec les sondes FRET, trois échantillons sur six sont amplifiés (contre cinq sur six en SYBR Green I). De plus, pour les trois échantillons amplifiés ( $10^5$ ,  $10^4$  et  $10^3$  toxoplasmes par prise d'essai) les Cp obtenus sont élevés : 23,9 ; 31,85 et 36 (contre 18,24 ; 21,75 et 25,53 en SYBR Green I).



Nous avons déduit de cette comparaison que c'est la phase de détection par les sondes FRET en tandem qu'il faut optimiser. Nous avons donc décidé de modifier un par un les paramètres se rapportant aux sondes (concentration des sondes, température de l'étape d'hybridation) et de conserver les autres paramètres validés en système SYBR Green I (concentration des amorces, durée et température de l'élongation et de la dénaturation).

La concentration finale en sondes, initialement à 0,2  $\mu\text{moles/l}$  a donc été augmentée jusqu'à 0,4  $\mu\text{moles/l}$  mais sans amélioration des résultats : les  $C_p$  restent très tardifs et seulement trois échantillons sur six sont amplifiés. Puis, pour favoriser l'appariement des sondes à leur séquence cible, il a été décidé de diminuer la température de l'étape d'hybridation. Celle-ci est passée alors de 60°C à 55°C mais les échantillons avec de faibles concentrations en toxoplasmes n'ont toujours pas été amplifiés (le dernier échantillon amplifié est celui avec 1000 toxoplasmes par prise d'essai).

Ainsi, même si les deux couples d'amorces et de sondes devaient en théorie fonctionner ensemble, en pratique il est très difficile de les associer afin de mettre au point une PCR en temps réel sensible puisque notre limite de détection est 1000 toxoplasmes par prise d'essai ce qui n'est pas satisfaisant.

Nous n'avons donc pas poursuivi l'étude de cette PCR en temps réel, notamment l'établissement de la droite d'étalonnage car l'utilisation du SYBR Green I ne nous semble pas adapté à l'analyse des échantillons biologiques (Edvinsson *et al*, 2004).

Une seule équipe a pour l'instant étudié ce gène largement répété dans un système en temps réel (avec des sondes FRET en tandem). Les amorces et sondes décrites par Reischl *et al* sont différentes des nôtres et permettent de diminuer la limite de détection par rapport à une PCR se basant sur l'amplification du gène B1 (Reischl *et al*, 2003). Il serait donc intéressant de continuer à travailler sur ce gène répété plus de 200 fois et hautement conservé chez *T. gondii* mais en utilisant une autre combinaison d'amorces et de sondes. Nous pouvons dans l'avenir soit concevoir une nouvelle combinaison d'amorces et de sondes soit utiliser celle décrite par Reischl *et al* et qui a déjà donné des résultats intéressants (amplification de l'équivalent de 0,2 parasite).

## Perspectives

Le travail entrepris a permis de mettre au point une PCR en temps réel amplifiant le gène B1 et de l'appliquer à la détection et la quantification de *T. gondii* dans le liquide amniotique tout en conservant les amorces et le contrôle interne décrits dans le protocole de PCR classique utilisé au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble. Il serait intéressant par la suite de comparer cette PCR amplifiant le gène B1 avec une PCR amplifiant le gène de 529 bases car l'amplification de ce gène largement répété pourrait permettre la mise en place de PCR encore plus sensibles (Switaj *et al*, 2005). Il conviendrait donc de poursuivre la mise au point de la PCR en temps réel utilisant le gène de 529 bases mais en employant les amorces et les sondes décrites par Reischl *et al* ou en concevant un nouveau système amorces/sondes.

Concernant la RT-PCR utilisant le gène B1, la limite de détection pourrait encore être précisée et améliorée. Il est en effet possible d'augmenter le volume de la prise d'essai de la PCR puisque pour cette étude, le choix de ce volume était conditionné par les contraintes existantes pour la mise au point de la PCR amplifiant le gène de 529 bases. Nous voulions au départ comparer deux protocoles de RT-PCR et pour cela, le volume de prise d'essai devait être le même pour les deux PCR. Ce volume a ainsi été fixé à 5 µl. Pour améliorer notre limite de détection, nous pourrions donc envisager de doubler le volume de la prise d'essai. A plus long terme, l'arrivée dans les laboratoires des LightCycler® de 3<sup>ème</sup> génération permettra d'étudier un volume plus important de solution d'ADN extrait car les amplifications seront réalisées dans des capillaires pouvant contenir 100 µl de mélange réactionnel (au lieu de 20 µl actuellement). Ainsi, nous pouvons espérer augmenter encore la sensibilité de la PCR.

L'ensemble du travail réalisé avec les amorces JW 58 et JW 59 a été essentiellement technique et nous n'avons pas pu l'appliquer à de véritables prélèvements biologiques. En effet, les liquides amniotiques sont extraits dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble par la méthode rapide utilisant le TNN, méthode que nous avons abandonnée pour la mise au point de notre PCR en temps réel. Ainsi, nous n'avons pas pu inclure dans ce travail l'analyse de véritables liquides amniotiques par RT-PCR. Cette étude serait très intéressante et permettrait de comparer les résultats de la RT-PCR et de la PCR conventionnelle. Mais cela suppose le changement de la technique d'extraction utilisée actuellement au laboratoire de Parasitologie-Mycologie. Pour finir, une étude clinique portant sur un nombre important de séroconversions au cours

de la grossesse apparaît nécessaire afin de préciser l'intérêt de la quantification de la charge parasitaire dans le liquide amniotique lors d'une toxoplasmose congénitale.

Un autre objectif est l'application de cette technique de PCR en temps réel au diagnostic de la toxoplasmose de l'immunodéprimé qui devra être là encore suivie de l'étude évaluant l'intérêt de la quantification de la charge parasitaire chez ces patients. Nous pouvons envisager d'appliquer le même protocole à l'étude du LCR ou du LBA et d'établir des droites d'étalonnage à partir de dilutions d'une suspension de toxoplasmes dans de vrais milieux biologiques. Quant à la PCR à partir de prélèvements de sang périphérique, une étude conclut à une meilleure sensibilité de la PCR en temps réel lorsqu'elle est pratiquée sur la couche leucocytaire par rapport aux RT-PCR réalisées sur sang total ou sur sérum (Menotti *et al*, 2003). Ainsi, avant de passer à l'application de notre PCR en temps réel sur du sang il convient de déterminer une méthode d'extraction du culot leucocytaire efficace et compatible avec l'utilisation de sondes fluorescentes comme moyen de détection des amplifications. Une fois ce problème résolu, le diagnostic de la toxoplasmose des patients immunodéprimés par PCR en temps réel pourra être envisagé.

---

# Conclusions

**Thèse soutenue par :** Virginie MORAND

**Titre :**

Détection et quantification de *Toxoplasma gondii* par PCR en temps réel

Adaptation d'une PCR classique pour l'amplification du gène B1 avec les amorces JW 58 et JW 59

## CONCLUSIONS

La toxoplasmose congénitale reste encore aujourd'hui une infection fréquente aux conséquences parfois dramatiques. Le diagnostic prénatal est indispensable pour instaurer un traitement précoce et adapté qui diminue le risque de séquelles fœtales sévères. Ce diagnostic prénatal repose sur des méthodes classiques de mise en évidence de *Toxoplasma gondii* dans le liquide amniotique (inoculation à la souris, culture cellulaire) ; il a cependant pu être amélioré depuis plusieurs années grâce à la PCR.

La PCR en temps réel (RT-PCR) est une technique rapide, sensible, spécifique, automatisable et qui permet de quantifier l'ADN. Dans la littérature, huit protocoles de PCR en temps réel ont été décrits pour la détection et la quantification de *T. gondii* dans différents milieux biologiques (liquide amniotique, sang, LCR). Parmi les études réalisées, deux suggèrent l'intérêt de déterminer la charge parasitaire dans le liquide amniotique par RT-PCR afin de préciser le risque de séquelles fœtales.

Une PCR conventionnelle amplifiant le gène B1 de *T. gondii* et utilisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble depuis plusieurs années a été adaptée afin de mettre au point une PCR en temps réel. Cette RT-PCR utilise donc le couple d'amorces JW 58 et JW 59 ainsi que le contrôle interne (un plasmide amplifié par les mêmes amorces) décrits dans le protocole de cette PCR conventionnelle.

La première étape de mise au point de la RT-PCR a été effectuée avec le SYBR Green I, agent intercalant détectant les brins d'ADN néosynthétisés ; elle a consisté en l'optimisation des paramètres de l'amplification.

Puis nous avons utilisé le système de détection fonctionnant avec deux sondes FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) en tandem. Deux couples de sondes FRET ont donc été synthétisés : le premier couple permet de détecter le gène B1 et le second le contrôle interne. L'amplification du gène cible de *T. gondii* en présence d'un véritable contrôle interne est une caractéristique technique très importante de notre PCR. En effet, beaucoup de protocoles de RT-PCR décrits dans la littérature n'ont pas de véritable contrôle interne.



Au cours de ce travail, l'ADN de *T. gondii* n'a pas pu être extrait par la méthode rapide par ébullition utilisée au laboratoire car celle-ci s'est révélée incompatible avec le système de détection par les sondes FRET en tandem. Nous avons donc choisi une autre méthode d'extraction purifiant les acides nucléiques sur des colonnes de centrifugations.

La PCR en temps réel mise au point est reproductible (coefficient de variation de 0,9% à 3,1%) et spécifique (spécificité de 100%). De plus, une droite d'étalonnage en six points (1 à 10<sup>5</sup> toxoplasmes par prise d'essai) a été obtenue à partir de dilutions de toxoplasmes dans le liquide amniotique. Notre approche de la quantification permet ainsi une réelle appréciation de la charge parasitaire.

Enfin nous avons validé cette PCR sur un modèle expérimental d'échantillons de liquide amniotique artificiellement infectés (1, 2, 4, 5, 10 ou 20 toxoplasmes/ml de liquide amniotique). Nous avons pu ainsi déterminer une limite de détection de un toxoplasme/ml de liquide amniotique si trois PCR sont réalisées à partir de l'échantillon d'ADN extrait.


Parallèlement, nous avons souhaité comparer cette PCR en temps réel amplifiant le gène B1 avec une autre PCR en temps réel détectant un gène de 529 bases répété 200 à 300 fois. Une première étape utilisant le SYBR Green I a permis l'amplification de ce gène en présence d'un témoin interne-externe, la  $\beta$  globine. En revanche, il n'a pas été possible, avec détection par des sondes FRET en tandem, de mettre au point une RT-PCR suffisamment sensible (limite de détection de 1000 toxoplasmes par prise d'essai).

L'évaluation de notre PCR en temps réel sur de véritables liquides amniotiques s'avère maintenant nécessaire afin de préciser l'intérêt de quantifier la charge parasitaire dans le liquide amniotique. Cette PCR en temps réel pourrait également être évaluée sur d'autres types d'échantillons biologiques (sang, LCR, biopsie...) afin d'améliorer le diagnostic et le suivi de la toxoplasmose des patients immunodéprimés.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER


Grenoble, le 12 avril 2005

LE DOYEN

  
Professeur P. Demenge



LE PRESIDENT DE THESE

  
Professeur R. Grillot

---

## Références bibliographiques

1. **Abraham B, Tamby I, Reynes J and Bastien P.** Polymerase chain reaction on sputum for the diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in AIDS patients. *Aids* 2000, 7, 910-911.
2. **Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P and Darde ML.** Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 2002, 5, 684-689.
3. **Ambroise-Thomas P, Schweitzer M, Pinon JM and Thiebaugeorges O.** Prevention of congenital toxoplasmosis in France. Risk assessment. Results and perspectives of prenatal screening and newborn follow up. *Bull Acad Natl Med* 2001, 4, 665-683
4. **Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoff C, Schwantje H and Ribble CS.** Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect* 1999, 2, 305-315.
5. **Barcan LA, Dallurzo ML, Clara LO, Valledor A, Macias S, Zorkin E, Gerona S and Livellara B.** *Toxoplasma gondii* pneumonia in liver transplantation : survival after a severe case of reactivation. *Transpl Infect Dis* 2002, 2, 93-96.
6. **Barragan A and Sibley LD.** Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol* 2003, 9, 426-430.
7. **Bastien P.** Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, 205-215.
8. **Bell AS and Ranford-Cartwright LC.** Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002, 8, 337-342.
9. **Bellete B, Flori P, Hafid J, Raberin H and Tran Manh Sung R.** Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler. *J Microbiol Methods* 2003, 1, 213-219.



10. **Bernard PS and Wittwer CT.** Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002, 8, 1178-1185.
11. **Black MW and Boothroyd JC.** Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 3, 607-623.
12. **Bossi P and Bricaire F.** Severe acute disseminated toxoplasmosis. *Lancet* 2004, 9434, 579.
13. **Botterel F, Ichai P, Feray C, Bouree P, Saliba F, Tur Raspa R, Samuel D and Romand S.** Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2002, 5, 1648-1650.
14. **Boulot P, Deschamps F, Lefort G, Sarda P, Mares P, Hedon B, Laffargue F and Viala JL.** Pure fetal blood samples obtained by cordocentesis: technical aspects of 322 cases. *Prenat Diagn* 1990, 2, 93-100.
15. **Bretagne S.** Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect* 2003, 6, 505-511.
16. **Bretagne S, Costa JM, Foulet F, Jabot-Lestang L, Baud-Camus F and Cordonnier C.** Prospective study of *Toxoplasma* reactivation by polymerase chain reaction in allogeneic stem-cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2000, 3, 127-132.
17. **Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, Al-Mohsen I, Almodavar E, Gutierrez MI and Bhatia K.** Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol* 2005, 243-248.
18. **Buchbinder S, Blatz R and Rodloff AC.** Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003, 4, 269-271.

19. **Burg JL, Grover CM, Pouletty P and Boothroyd JC.** Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989, 8, 1787-1792.
20. **Burkardt HJ.** Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med* 2000, 2, 87-91.
21. **Carruthers VB.** Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 2002, 2, 111-122.
22. **Cazenave J, Forestier F, Bessieres MH, Broussin B and Begueret J.** Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn* 1992, 2, 119-127.
23. **Chandrasekar PH.** Real-time polymerase chain reaction for early diagnosis of toxoplasmosis in stem cell transplant recipients: ready for prime time? *Clin Infect Dis* 2005, 1, 79-81.
24. **Cornelissen AW, Overdulve JP and van der Ploeg M.** Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology* 1984, 3, 531-553.
25. **Costa JM, Ernault P, Gautier E and Bretagne S.** Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Prenat Diagn* 2001, 2, 85-88.
26. **Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C and Bretagne S.** Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2000, 8, 2929-2932.
27. **Couvreur J, Thulliez P, Daffos F, Aufrant C, Bompard Y, Gesquiere A, Desmonts G, Hohlfeld P, MacAleese J, Descombey D and Forestier F.** In utero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pyrimethamine-sulfadiazine. *Fetal Diagn Ther* 1993, 1, 45-50.

28. **Cox FE.** History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002, 4, 595-612.
29. **Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Aufrant C, Valenti D and Cox WL.** Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med* 1988, 5, 271-275.
30. **de Medeiros BC, de Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R and Bleggi-Torres LF.** Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transpl Infect Dis* 2001, 1, 24-28.
31. **Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L and Bennouna S.** Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* 2004, 3, 411-421.
32. **Derouin F, Thulliez P, Candolfi E, Daffos F and Forestier F.** Early prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis using amniotic fluid samples and tissue culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988, 3, 423-425.
33. **Desmots G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P and Chartier M.** Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1985, 8427, 500-504.
34. **Desmots G, Naot Y and Remington JS.** Immunoglobulin M immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol* 1981, 5, 486-491.
35. **Drago L, Lombardi A, De Vecchi E, Giuliani G, Bartolone R and Gismondo MR.** Comparison of nested PCR and real time PCR of *Herpesvirus* infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infect Dis* 2004, 1, 55.
36. **Dubey JP.** Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1998, 7, 1019-1024.
37. **Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C and Gilbert R.** Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999, 9167, 1829-1833.

38. **Dupouy-Camet J, de Souza SL, Maslo C, Paugam A, Saimot AG, Benarous R, Tourte-Schaefer C and Derouin F.** Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993, 7, 1866-1869.
39. **Dzierszynski F, Nishi M, Ouko L and Roos DS.** Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell* 2004, 4, 992-1003.
40. **Edvinsson B, Jalal S, Nord CE, Pedersen BS and Evengard B.** DNA extraction and PCR assays for detection of *Toxoplasma gondii*. *Apmis* 2004, 6, 342-348.
41. **Filisetti D and Candolfi E.** Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita* 2004, 1, 71-80.
42. **Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, Villard O and Candolfi E.** Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. *J Clin Microbiol* 2003, 10, 4826-4828.
43. **Flori P, Hafid J, Thonier V, Bellete B, Raberin H and Tran Manh Sung R.** Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Parasite* 2003, 2, 133-140.
44. **Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, Jenum PA, Hedman K and Naessens A.** Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 2, 410-415.
45. **Frenkel JK, Nelson BM and Arias-Stella J.** Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis: clinical and experimental aspects. *Hum Pathol* 1975, 1, 97-111.
46. **Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Racinet C, Grefenstette I, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A and Ambroise-Thomas P.** Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, *in vivo*, and *in vitro* cultures. *Placenta* 1998, 7, 545-549.

47. **Friedman S, Ford-Jones LE, Toi A, Ryan G, Blaser S and Chitayat D.** Congenital toxoplasmosis: prenatal diagnosis, treatment and postnatal outcome. *Prenat Diagn* 1999, 4, 330-333.
48. **Glazer AN and Mathies RA.** Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Curr Opin Biotechnol* 1997, 1, 94-102.
49. **Gray F, Chretien F, Vallat-Decouvelaere AV and Scaravilli F.** The changing pattern of HIV neuropathology in the HAART era. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003, 5, 429-440.
50. **Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM.** Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996, 10, 986-994.
51. **Hezard N, Marx-Chemla C, Foudrinier F, Villena I, Quereux C, Leroux B, Dupouy D, Talmud M and Pinon JM.** Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in 261 pregnancies. *Prenat Diagn* 1997, 11, 1047-1054.
52. **Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P and Autenrieth IB.** Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. *J Med Microbiol* 2004, 7, 629-632.
53. **Hill D and Dubey JP.** *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002, 10, 634-640.
54. **Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F and Vidaud M.** Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994, 11, 695-699.
55. **Hohlfeld P, Daffos F, Thulliez P, Aufrant C, Couvreur J, MacAleese J, Descombey D and Forestier F.** Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr* 1989, 1, 765-769.
56. **Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J and Verschueren H.** Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000, 1, 69-75.

57. **Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A and Fach P.** Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. *J Appl Microbiol* 2004, 2, 221-222.
58. **Horejsh D, Martini F, Poccia F, Ippolito G, Di Caro A and Capobianchi MR.** A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 2005, 2, 13.
59. **Howe DK and Sibley LD.** *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995, 6, 1561-1566.
60. **Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC and Work K.** Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J* 1970, 689, 142-144.
61. **Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP and Lunney JK.** Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2001, 6, 2065-2071.
62. **Jones JL, Kruszon-Moran D and Wilson M.** *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000. *Emerg Infect Dis* 2003, 11, 1371-1374.
63. **Kaboev OK, Luchkina LA, Tret'iakov AN and Bahrmand AR.** PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). *Nucleic Acids Res* 2000, 21, 94.
64. **Klein D.** Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002, 6, 257-260.
65. **Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok H, Siegert W and Janitschke K.** Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Infect* 2001, 3, 120-124.
66. **Lachnik J, Ackermann B, Bohrssen A, Maass S, Diephaus C, Puncken A, Stermann M and Bange FC.** Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2002, 9, 3364-3373.

67. **Lacombe K and Girard PM.** A 2004 update on treatment and prophylaxis of opportunistic infections in the course of HIV disease. *Med Mal Infect* 2004, 6, 239-245.
68. **Lieberman LA and Hunter CA.** The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int Rev Immunol* 2002, 4-5, 373-403.
69. **Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC and Tseng CP.** Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000, 11, 4121-4125.
70. **Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W and Deetz K.** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995, 6, 357-362.
71. **Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, Craven PC, Strandberg DA, File TM, Rice N and Meunier-Carpentier F.** Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. *Lancet* 1983, 8328, 781-784.
72. **Lynfield R and Guerina NG.** Toxoplasmosis. *Pediatr Rev* 1997, 3, 75-83.
73. **Martino R, Bretagne S, Einsele H, Maertens J, Ullmann AJ, Parody R, Schumacher U, Pautas C, Theunissen K, Schindel C, Munoz C, Margall N and Cordonnier C.** Early detection of *Toxoplasma* infection by molecular monitoring of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005, 1, 67-78.
74. **Mary C, Faraut F, Lascombe L and Dumon H.** Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004, 11, 5249-5255.
75. **Menotti J, Vilela G, Romand S, Garin YJ, Ades L, Gluckman E, Derouin F and Ribaud P.** Comparison of PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. *J Clin Microbiol* 2003, 11, 5313-5316.

76. **Montoya JG and Liesenfeld O.** Toxoplasmosis. *Lancet* 2004, 9425, 1965-1976.
77. **Munir A, Zaman M and Eltorky M.** *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pancreas transplant patient. *South Med J* 2000, 6, 614-617.
78. **Niesters HG.** Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 2004, 1, 5-11.
79. **Ordinaire I, Simon A, Frealle E, Soula F, Valat AS, Rouland V, Subtil D, Dei-Cas E, Camus D and Delhaes L.** Real-time quantitative PCR for toxoplasmosis diagnosis. *Ann Biol Clin* 2005, 1, 67-73.
80. **Pagano L, Trape G, Putzulu R, Caramatti C, Picardi M, Nosari A, Cinieri S, Caira M and Del Favero A.** *Toxoplasma gondii* infection in patients with hematological malignancies. *Ann Hematol* 2004, 9, 592-595.
81. **Pelloux H, Brun E, Vernet G, Marcillat S, Jolivet M, Guergour D, Fricker-Hidalgo H, Goullier-Fleuret A and Ambroise-Thomas P.** Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the Vidas system (bioMerieux). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998, 2, 69-73.
82. **Pelloux H, Fricker-Hidalgo H, Pons JC, Bost-Bru C, Brenier-Pinchart MP, Jouk PS and Ambroise-Thomas P.** Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate. *Arch Pediatr* 2002, 2, 206-212.
83. **Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessieres MH, Blatz R, Del Pezzo M, Girault V, Gratzl R, Holberg-Petersen M, Johnson J, Kruger D, Lappalainen M, Naessens A and Olsson M.** A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 2, 231-237.
84. **Pelloux H, Weiss J, Simon J, Muet F, Fricker-Hidalgo H, Goullier-Fleuret A and Ambroise-Thomas P.** A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1996, 1, 11-15.



85. **Petersson K, Stray-Pedersen B, Malm G, Forsgren M and Evengard B.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000, 10, 824-829.
86. **Plantier JC, Gueudin M, de Oliveira F, Damond F, Lemee V, Brun-Vezinet F and Simon F.** Rapid discrimination between human immunodeficiency virus type 2 groups A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004, 12, 5866-5870.
87. **Porter SB and Sande MA.** Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992, 23, 1643-1648.
88. **Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, Poizot-Martin I, Morlat P, Dupas B, Mussini JM and Lepout C.** A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. The BIOTOXO Study Group. *Aids* 1997, 2, 177-184.
89. **Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P and Costa JM.** Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 2003, 1, 7.
90. **Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Darde ML, Disko R, Dreazen O, Dumon H, Grillo R, Gross U, Hayde M, Holliman R, Ho-Yen DO, Janitschke K, Jenum PA, Naser K, Olszewski M, Thulliez P and Seitz HM.** The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ* 1999, 11, 929-935.
91. **Remington JS, Miller MJ and Brownlee I.** IgM antibodies in acute toxoplasmosis. *Pediatrics* 1968, 6, 1082-1091.
92. **Remington JS, Thulliez P and Montoya JG.** Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004, 3, 941-945.
93. **Ririe KM, Rasmussen RP and Wittwer CT.** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997, 2, 154-160.

94. **Robert F, Ouatas T, Blanche P, Tourte-Schaefer C, Sicard D and Dupouy-Camet J.** Retrospective evaluation of the detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in AIDS patients. *Presse Med* 1996, 11, 541-545.
95. **Robert-Gangneux F, Gavinet MF, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaefer C and Dupouy-Camet J.** Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *J Clin Microbiol* 1999, 9, 2893-2898.
96. **Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, Dumon H, Peyron F, Thulliez P and Picot S.** Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol* 2004, 3, 797-802.
97. **Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F and Dumon H.** Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* 2001, 2, 296-300.
98. **Rys PN and Persing DH.** Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 1993, 9, 2356-2360.
99. **Savva D, Morris JC, Johnson JD and Holliman RE.** Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol* 1990, 1, 25-31.
100. **Sibley LD.** Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 2004, 5668, 248-253.
101. **Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM and Howe DK.** Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002, 1417, 81-88.
102. **Simon A, Labalette P, Ordinaire I, Frealle E, Dei-Cas E, Camus D and Delhaes L.** Use of fluorescence resonance energy transfer hybridization probes to evaluate quantitative real-time PCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004, 8, 3681-3685.

103. **Stevens SJ, Verkuijlen SA, Brule AJ and Middeldorp JM.** Comparison of quantitative competitive PCR with LightCycler-based PCR for measuring Epstein-Barr virus DNA load in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2002, 11, 3986-3992.
104. **Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW and Sibley LD.** Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 16, 10753-10758.
105. **Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD and Remington JS.** Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988, 4851, 516-518.
106. **Switaj K, Master A, Skrzypczak M and Zaborowski P.** Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect* 2005, 3, 170-176.
107. **Taggart EW, Carroll KC, Byington CL, Crist GA and Hillyard DR.** Use of heat labile UNG in an RT-PCR assay for enterovirus detection. *J Virol Methods* 2002, 1, 57-65.
108. **Tenter AM, Heckeroth AR and Weiss LM.** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000, 12-13, 1217-1258.
109. **Teo IA, Choi JW, Morlese J, Taylor G and Shaunak S.** LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. *J Immunol Methods* 2002, 1, 119-133.
110. **Tinti M, Possenti A, Cherchi S, Barca S and Spano F.** Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2003, 14, 1605-1616.
111. **Tissot Dupont D, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Ambroise-Thomas P and Pelloux H.** Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003, 2, 122-125.
112. **Torre D, Casari S, Speranza F, Donisi A, Gregis G, Poggio A, Ranieri S, Orani A, Angarano G, Chiodo F, Fiori G and Carosi G.** Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic

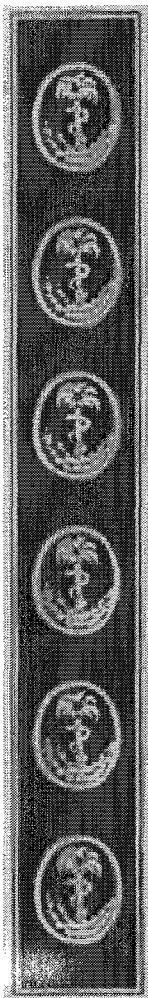
- encephalitis in patients with AIDS. Italian Collaborative Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 6, 1346-1349.
113. **Tse C and Capeau J.** Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids. *Ann Biol Clin* 2003, 3, 279-293.
114. **Tyagi S and Kramer FR.** Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996, 3, 303-308.
115. **Vandenbroucke, II, Vandesompele J, Paepe AD and Messiaen L.** Quantification of splice variants using real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 13, 68.
116. **Vidigal PV, Santos DV, Castro FC, Couto JC, Vitor RW and Brasileiro Filho G.** Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002, 1, 1-6.
117. **Vutova K, Peicheva Z, Popova A, Markova V, Mincheva N and Todorov T.** Congenital toxoplasmosis: eye manifestations in infants and children. *Ann Trop Paediatr* 2002, 3, 213-218.
118. **Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C and Peyron F.** Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 2004, 6, 1567-1572.
119. **Wilkening S and Bader A.** Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. *J Biomol Tech* 2004, 2, 107-111.
120. **Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997, 1, 130-131.
121. **Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA and Balis UJ.** The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997, 1, 176-181.

122. Zufferey J, Hohlfeld P, Bille J, Fawer CL, Blanc D, Pinon JM and Vaudaux B. Value of the comparative enzyme-linked immunofiltration assay for early neonatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatr Infect Dis J* 1999, 11, 971-975.





# Serment des Apothicaire



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Titre :** Détection et quantification de *Toxoplasma gondii* par PCR en temps réel

Adaptation d'une PCR classique pour l'amplification du gène B1 avec les amorces JW 58 et JW 59

**Résumé :** La toxoplasmose est une parasitose mondialement répandue causée par un protozoaire, *Toxoplasma gondii*. Elle est à l'origine de lésions cliniques sévères chez le fœtus et le patient immunodéprimé. En cas de contamination d'une femme enceinte, il est nécessaire de diagnostiquer une transmission fœtale afin d'instaurer un traitement diminuant le risque de séquelles graves. Ce diagnostic anténatal repose sur des méthodes classiques de mise en évidence du parasite dans le liquide amniotique et sur la PCR. Afin de préciser le pronostic fœtal, deux études suggèrent l'intérêt de déterminer la charge parasitaire dans le liquide amniotique par PCR en temps réel.

Nous avons mis au point une PCR en temps réel (RT-PCR) à partir d'une PCR classique amplifiant le gène B1 avec les amorces JW 58 et JW 59 en présence d'un véritable contrôle interne. L'optimisation des paramètres de l'amplification a été réalisée avec le SYBR Green I. Puis la détection des amplifications a été effectuée à l'aide de sondes FRET en tandem. Notre RT-PCR est spécifique et reproductible ; une droite d'étalonnage permet la quantification de la charge parasitaire dans le liquide amniotique pour des concentrations de 1 à 10<sup>5</sup> toxoplasmes par prise d'essai. De plus, nous avons évalué cette RT-PCR sur des échantillons de liquide amniotique artificiellement contaminés : notre technique permet la détection d'un toxoplasme/ml de liquide amniotique.

Nous avons souhaité comparer la RT-PCR amplifiant le gène B1 à une deuxième PCR en temps réel amplifiant un gène répété plus de 200 fois dans le génome de *T. gondii*. Cependant, il n'a pas été possible, avec les amorces et les sondes FRET utilisées, de mettre au point une RT-PCR suffisamment sensible.

Notre PCR en temps réel doit maintenant être évaluée sur de véritables liquides amniotiques afin de préciser la corrélation entre la charge parasitaire et l'importance de l'atteinte fœtale. Elle devra également être évaluée sur d'autres milieux biologiques (sang, LCR) pour permettre le diagnostic et le suivi de la toxoplasmose du patient immunodéprimé.

**Jury :** Madame le Professeur R. Grillot, Président du jury, Professeur de Pharmacie

Monsieur H. Pelloux, Professeur de Médecine

Madame M. P. Brenier-Pinchart, Docteur en Médecine

Madame V. Equy, Docteur en Médecine

Madame H. Fricker-Hidalgo, Docteur en Pharmacie

**Mots clés :** PCR en temps réel, *Toxoplasma gondii*, liquide amniotique, toxoplasmose congénitale

**Auteur :** MORAND-BUI Virginie, 5 rue Servan, 38000 Grenoble