

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département de biologie des populations et des organismes

Mémoire

De fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master II en biologie

Option : Reproduction Animale

Thème

L'étude Sérologique et Moléculaire du *Toxoplasma gondii*

Chez la Femme Enceinte et son Impacte sur la Fertilité

Présenté par

Melle SMAHI Nora

Mme AMADJ Rachida

Soutenu Publiquement le :

Devant le jury composant de

Président	: M. BESSAD A	MCB	Blida 1
Examineur	: M. BELLALA R	MCB/ISV	Blida 1
Promotrice	: Mme MIMOUNE N	MCB/ENSV	Bab Ezzouar
Copromoteur	: M. ABDELWAHED K	MAA	HCA
Invité d'honneur	: M KAIDI R	Prof/ ISV	Blida 1

2016/2017

Dédicaces

A la mémoire de mon très cher père vénéré SMAHI RABEH
BEN LOUNIS, ancien moudjahid et cadre de la nation : très grand
hommage

A ma très chère mère, à qui je dédie ce Modest travail, en guise
de remerciement pour tout ce qu'elle m'a donné sans cesse.

A mes sœurs, mes frères, mes neveux, ainsi qu'à chaque membre
de ma famille et mes amies qui m'estiment et me soutiennent.

Nora.

Dédicaces

Je dédie le fruit de mes études

À la plus chère personne du monde, à maman qu'aucune ne
dédicace ne saurait exprimer mon respect et mes sentiments pour
l'amour, l'attention et les sacrifices consentis.

Qui est toujours dans mon cœur, qui a consacré sa vie pour mon
éducation et ma réussite, qui m'a encouragé dans les moments les plus
difficiles, je prie dieu le tout puissant de vous garder auprès de nous et
de vous donner la santé et la force pour terminer jusqu'au bout. Je leur
devrai de l'aimer encore plus, quoi que rien ne puisse égaler leur
amour.

À Tous mes chères sœurs et mes chers frères.

À Toute ma famille et mes amis sans exception.

Ainsi que tous les étudiants et les étudiantes de l'option
reproduction Animale promotion 2016. Tous ceux qui m'aiment et
que j'aime

Rachida

Remerciements

A Mm MIMOUNE Nora Maitre de conférences, notre promotrice pour toute l'aide qu'elle nous à aimablement accordé, qu'elle veuille bien accepter en hommage notre respectueuse reconnaissance.

A M ABDELWAHED Khaled parasitologue et Maitre assistant au HCA ; notre copromoteur pour la bienveillance dont il à fait preuve et son aide indéfectible au courant de notre stage au sein du laboratoire de parasitologie Ain Naadja, qu'il veuille bien accepter en hommage notre respectueuse reconnaissance.

A M BESSAD Amine Responsable de la promotion master II option reproduction, qui nous a fait l'honneur de faire partie du jury : hommage respectueux.

A Mr BELLALA Réda qui nous fait l'honneur d'examiner notre travail : hommage respectueux.

Au professeur KAIDI Rachid, qui nous à constamment encouragé et conseillé de progresser : veuillez accepter en hommage notre respectueuse reconnaissance.

A Mm ADJMI responsable du laboratoire de parasitologie du HCA Ain Naadja qui nous a accueillie dans son service, afin de réaliser ce travail et d'effectuer nos différentes recherches au sein du laboratoire : hommage respectueux

A tous nos professeurs qui ont assuré notre formation, pour les conseils et leurs encouragements : hommage respectueux.

Au personnel du laboratoire de parasitologie de l'HCA Ain Naadja, et toute personne qui nous a aidé : hommage respectueux.

Liste des Abréviations

EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
AL	Tampon de lyse
AW1	Tampon de lavage 1
AW2	Tampon de lavage 2
ATL	Tampon de lyse des tissus
BET	Bromure d'éthidium
PBS	Tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigène
Ac	Anticorps
PCR	Polymerase Chain Reaction
ARN	Acid ribonucleique
pb	Paires de bases
dNTP	désoxyribo Nucléotide Triphosphate
MgCl₂	chlorure de magnésium
TAE	Tris, Acétate, EDTA
MO	Moelle osseuse
SRH	système réticulo-histiocytaire
DL	Dose létale
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SAG1	domaine protéique à la surface du protozoire parasite <i>T.gondii</i>
P30	Antigène de surface du protozoaire parasite <i>T.gondii</i>
IgG, M, A, E	Immunoglobulines G, M, A, E
ISAGA	Immuno Sorbent Agglutination Assay
LCR	liquid céphalorachidien
MGG	May-Grunwald-Giemsa
THP1	lignée cellulaire de monocytes humains
MRC5	lignée de cellules de type fibroblastique embryonnaire humains
ELFA	la Technique Enzym Linked Fluorescence Assay
Ha et H	humeur aqueuse
S	sérum
M	mère
P	Placentas
T.gondi	Toxoplasma gondii

Liste des Figures

Figure 01 : Ultra structure du Tachyzoite	04
Figure 02 : kyste de <i>Toxoplasma gondii</i>	04
Figure 03 : Oocyste de <i>Toxoplasma gondii</i>	05
Figure 04 : Cycle évolutif de <i>Toxoplasma gondii</i>	06
Figure 05 : Statut global de la séroprévalence de <i>Toxoplasma gondii</i> dans le monde.	11
Figure 06 : Photo d'un nouveau-né présentant une hydrocéphalie due à une Toxoplasmose congénitale (Dubey JP ,Beattie CP Toxoplasmosis of animals and man CRC).	15
Figure 07 : Lésion Toxoplasmique récente sur fond d'œil (Roberts.F, Mcleod.R pathogénésis of toxoplasmique retinochoriotidis parasitol).	15
Figure 08 : Lésion toxoplasmique cicatricielle sur fond d'œil (Roberts.F,Mcleod.R pathogénésis of toxoplasmique retinochoriotidis parasitol).	16
Figure 09 : L'automate VIDAS (technique de sérologie ELFA)(photo original)	30
Figure 10 : Western Blot (WB))(photo original)	31
Figure 11 : Mode opératoire de l'extraction d'ADN des Tachyzoites de <i>Toxoplasma gondii</i> à partir des tissus (photo original).	32
Figure 12 : Mode opératoire de l'extraction d'ADN des tachyzoites de <i>Toxoplasma gondii</i> à partir des tissus Qiamp DNA minikit .)(photo original)	33
Figure 13 : Extracteur automatique (SaCace,biotechnologie ; Sag Mag 12))(photo original)	34
Figure 14 : Différentes étapes d'extraction d'ADN de <i>toxoplasma gondii</i> dans les selles de chats par la méthode kit kiagen.)(photo original)	35
Figure 15 : Résultats d'amplification d'ADN par l'amorce JW62/JW6 par le protocole pelloux et al.1997.	36
Figure 16 : résultats d'amplification d'ADN parasitaire extrait à partir des tachyzoites en utilisant l'amorce JW62/JW63 par la méthode Master Mix. (Photo original)	37
Figure 17 : Hôte de préparation du Mix (photo original)	38
Figure 18 : Différentes étapes de préparation du Mix (photo original)	38
Figure 19 : Amplification d'ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> (dénaturation, hybridation, élongation) (photo original)	39
Figure 20 : Etapes d'électrophorèse de révélation d'ADN (photo original)	43

Figure 21 : Différentes étapes d'examen microscopique des selles (chats et brebis) (photo original)	44
Figure 22 : Répartition du Profile du profil sérologique des femmes enceintes obtenus par l'automate VIDAS (photo original)	45
Figure 23 : Profil serologique des IgG/IgM positif chez la mère (M) et même profil chez l'enfant à j90 donc pas d'infection foetal (photo original)	47
Figure 24 : profil des IgG de l'enfant (E) identique de celui de sa mère (M) et présence des IgM néo synthétisé chez l'enfant. (Photo original)	47
Figure 25 : Analyse des profils positifs IgG-IgM anti <i>Toxoplasma gondii</i> . (Photo original)	48
Figure 26 : analyse des profils négatifs IgG /IgM anti toxoplasma gondii (sérum/humeur aqueuse)(photo original)	48
Figure 27 : Résultats de la PCR parasitaire extrait des placentas par l'amorce JW62/JW63)(photo original)	49
Figure 28 : Résultats d'amplification d'ADN parasitaire extrait des placentas par l'amorce JW62/JW63.(photo original)	49
Figure 29 : Résultats d'examen microscopique des selles de chats et brebis. (Photo original)	50
Figure 30 : Résultats d'examen parasitaire des selles de chats au microscope optique x10,x40(photo original)	51
Figure 31 : Résultats d'examen de serum de brebis par la PCR. (Photo original)	52

Liste des Tableaux

Tableau I : Séroprévalence de la Toxoplasmose en Algérie.	10
Tableau II : Protocole d'amplification d'ADN selon le protocole de Pelloux et al 1998.	36
Tableau III : Protocole d'amplification avec l'amorce JW62/JW63 en utilisant le master Mix.	37
Tableau IV : Pouvoir de séparation d'ADN selon la concentration d'agarose du gel.	40
Tableau V : Profil sérologique des femmes enceintes par l'automate VIDAS.	45
Tableau VI : Profil sérologique des 11 couples sérum mère-enfant obtenu par western blot.	46
Tableau VII : Profil des couples (sérum /humeur aqueuse) obtenu par western blot.	47
Tableau VIII : Résultat de la PCR à partir d'ADN extrait du placenta.	49
Tableau IX : Résultats de la PCR et l'examen parasitaire direct au microscope optique x10, x40 de la selle de chats.	51
Tableau X : Résultat de la PCR à partir des sérums de brebis.	52

Table des Matières

Dédicaces	I
Remerciements	II
Liste des symboles ou abréviation	III
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
Sommaire	VI
Introduction	VII
Partie Théorique	
I. Définition	01
II. Historique	01
III. Etude de l'agent pathogène	02
1. Taxonomie	03
2. Morphologie	03
2-1. Le tachyzoite /trophozoite	03
2-2. Le kyste toxoplasmique	03
2-3. L'oocyste	03
3. Cycle évolutif	05
3-1. La phase coccidienne	05
3-2. La phase libre	05
3-3. La phase proliférative	06
4. Mode de contamination	07
➤ a- Contamination humaine	07
4-1. La primo-infection	07
4-2. Par réactivation endogène	07
4-3. Par réinfestation	08
➤ b- Contamination animale	08
IV. Epidémiologie de la toxoplasmose	08
➤ a- Séroprévalence humaine	08
1. Prévalence de la toxoplasmose dans le monde	08
➤ b- séroprévalence animale	11
V. Physiopathologie et immunité anti-toxoplasmique	12
1. Pathogénie de la toxoplasmose	12
2. La réponse immunitaire	13
VI. Clinique	13
1. Toxoplasmose acquise	13
2. Toxoplasmose congénitale	14
2-1. Toxoplasmose du premier trimestre	14
2-2. Toxoplasmose du deuxième trimestre	14
2-3. Toxoplasmose du troisième trimestre	15

VII. Diagnostic	16
1. Diagnostic parasitologique	16
1-1. Examen direct	16
1-2. Inoculation à l'animal	16
1-3. Culture cellulaire	17
1-4. Biologie moléculaire	17
2. Diagnostic sérologique	17
2-1. Source d'antigène	17
2-2. Technique utilisant l'antigène figuré	18
2-2.1 Dye test	18
2-2.2 L'immunofluorescence indirect (IFI)	18
2-2.3 Agglutination	19
2-2-3.1 Agglutination direct classique	19
2-2-3.2 Agglutination sensibilisée	19
2-2-3.3 ISAGA (Immuno-Sorbent agglutination Assay)	19
2-3 Technique utilisant l'antigène soluble	19
2-3-1. ELISA direct	19
2-3-2. ELISA réverse et double sandwich	19
2-4 Technique complémentaires	20
2-4-1. Test d'avidité	20
2-4-2. Western Blot (WB)	20
3. Conduite diagnostique de la toxoplasmose	20
3-1. Evolution de la cinétique des anticorps	20
3-2. Diagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte	21
3-3. Diagnostic de la toxoplasmose congénitale	21
3-3-1. Diagnostic anténatal	21
3-3-2. Diagnostic néonatal	22
3-3-3. Diagnostic postnatal	22
VIII. Traitement de la toxoplasmose	22
IX. Prophylaxie	23
1. prévention primaire	23
2. Prévention secondaire	23
3-Rôle du vétérinaire dans le contrôle de la maladie toxoplasmique	23
4-La vaccination	23

Partie Pratique

I. Matériels et méthodes	25
II-1- Matériels	25
II-a-Matériels non biologiques	25
• Matériels utilisés pour la technique Enzym Linked Fluorescence ELFA	25
✓ Appareillage	25
✓ Consommables	25

✓ Coffret VIDAS Toxo IgG (Biomerieux)	25
• Matériels utilisé pour la technique Western Blot (WB)	25
✓ Appareillages	25
✓ Consommables	25
✓ Coffret Toxoplasma Western Blot IgG,IgM (LDBIO)	25
✓ Diagnostic	25
• Matériels utilisés pour la technique PCR(polymérase chaine réaction)	26
✓ Appareillages	26
✓ Consommables	26
✓ Coffret d'extraction	26
- Qiamp DNA Minikit ,Qiagen tissu et coffret d'extracteur automatique .	26
• Réactifs utilisés pour l'amplification.	26
• Réactifs utilisés pour l'électrophorèse d'ADN	26
• Matériels utilisés pour l'examen microscopique des selles.	26
II-b- Matériels biologique	27
• Matériels biologique analysés par la technique ELFA	27
• Matériels biologique analysés par la technique Western Blot	27
• Matériels biologique analysés par la technique PCR.	27
a- Témoin positif	27
b- Echantillons des prélèvements biologiques.	27
II-b-1-chez l'homme	27
b-1-1-Placenta	27
b-1-2-L'humeur aqueuse	27
b-1-3-Le sang du cordon ombilical	27
b-1-4-Sang périphérique	27
II-b-2-chez l'animal	27
b-2-1 Sang périphérique de brebis	27
b-2-2 selles des chats et brebis	27
II-2-Méthode :	28
II-A –Recherche des anticorps anti-toxoplasmiques par la technique Enzym	28
Linked Fluorescence Assay (ELFA)	
• Principe	28
• Etape de la technique ELFA.	28
• Mode opératoire du test VIDAS (ELFA) toxo IgG.	28
• Résultats	29
• Interprétation	29
II-B- Recherche des anticorps Anti-Toxoplasma gondii par le Western Blot	30
IgG-IgM.	
• Principe	30

• Mode opératoire	30
• Résultats et interprétations	31
- Toxoplasmose congénitale	31
- Toxoplasmose oculaire	31
II-C-Mise en évidence de l'ADN parasitaire de Toxoplasma gondii par la PCR.	31
II-1-Préparation des témoins	31
1-a-préparation du témoin positif	31
1-b-préparation du témoin négatif	31
II-2-Extraction d'ADN de Toxoplasma gondii :	31
➤ Kit Qiagen Qiamp DNA Minikit pour tissus	31
➤ Kit Qiagen stools pour l'extraction d'ADN des selles	31
➤ L'automate SagMAG12 (sacace) pour l'extraction d'ADN du sang	31
II-2-a-Extraction d'ADN de Toxoplasma gondii à partir des placentas par Mini Kit Qiagen .	32
• Principe	32
• Mode opératoire d'extraction pour tissu	32
II-2-b-Extraction d'ADN de Toxoplasma gondii à partir du sang par l'automate SagMag(sacace)	34
• Principe	34
• Mode opératoire	34
II-2-3-Kit Qiagen Stools pour l'extraction d'ADN des selles.	35
II-A –Amplification d'ADN extrait.	35
a-Principe	35
b-Amorce utilisées	35
c-Choix du protocole d'amplification	36
• Protocole d'amplification d'ADN des Tachyzoites par l'amorce JW62/JW63	37
1- Selon Pelloux	37
2- Selon le protocole Master Mix.	37
A-a-Préparation du Mix	38
A-b-La révélation par Electrophorèse sur gel d'agarose	39
• Principe	39
• Mode opératoire	39
II-B- La révélation	39
II-B -1-Principe d'électrophorèse	39
a-Gel d'agarose	40
b-Tampon	40
c-Bromure d'éthidium	41
II-B-2-Protocole opératoire	41
a. Préparation du gel d'agarose	41

b. Préparation et dépôt des produits d'amplification (les amplicons)	42
c. La migration	42
d. Lecture	42
II-3-Mode opératoire d'examen direct parasitaire des selles	44
II-3-1-Examen macroscopique	44
II-3-2-Examen microscopique	44
III-Résultats	45
III-1-Résultats sérologiques obtenus par l'automate VIDAS.	45
III-2- Résultats sérologiques obtenus par le Western Blot (WB)	46
• Résultats de la toxoplasmose congénitale	46
• Résultats de la toxoplasmose oculaire	47
III-3-Résultats du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose par la technique polymérase chaine réaction (PCR)	48
III-3-1-Résultats de la PCR à partir d'ADN extrait des Tachyzoites des placentas	48
III-3-2-Résultats de la PCR réalisée avec l'ADN extrait des <i>Toxoplasma gondii</i> à partir des liquides biologiques	50
III-4- Résultats d'examen parasitaire des selles de chats et brebis	50
III-5-Résultats de la PCR réalisée avec l'ADN extrait de <i>Toxoplasma gondii</i> dans les liquides biologiques (chez les chats et brebis)	50
III-5-1- Résultats de la PCR réalisée avec l'ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> extrait des selles de chats	50
III-5-2-Résultats de la PCR réalisée sur l'ADN de tachyzoites extrait du sang périphérique de brebis.	51
IV- Discussion	53
V-Conclusion	58
VI-Références bibliographiques	60
VII-Annexes	69
VIII. Résumé	

INTRODUCTION

Introduction

La toxoplasmose est une zoonose cosmopolite due à un parasite intracellulaire obligatoire, *Toxoplasma gondii*. Elle est certainement l'affection parasitaire la plus répandue dans le monde, sévissant sous toutes les latitudes et susceptible d'infecter toutes les espèces animales.

L'hôte définitif est représenté essentiellement par le chat et les hôtes intermédiaires par tous les mammifères et oiseaux, y compris l'homme. Cet organisme se loge obligatoirement dans toutes les cellules du corps, de préférence dans les cellules nerveuses, ophtalmiques, digestives ou musculaires (Fleger, 2014).

La Toxoplasmose est classiquement bénigne et souvent latente chez l'enfant et l'adulte mais redoutable chez le fœtus, le nouveau-né et le sujet immunodéprimé. Le Toxoplasme est source possible d'une maladie congénitale grave quand il infeste la femme enceinte (primo-infection).

La forme congénitale peut se manifester par de sévères malformations neurologiques et une atteinte de la rétine pouvant conduire à la cécité, et résulte d'une primo-infection toxoplasmique survenue pendant la grossesse (Desmots et al, 1985).

Chez les animaux, la maladie est semblable à celle de l'homme, elle constitue l'une des causes majeures d'avortement, résorption embryonnaire, mortinatalité ou naissance de chevreaux et agneaux chétifs chez les ruminants. Du point de vue de la santé publique et économique, l'ovine est l'espèce la plus affectée (Desmots et al, 1985).

Cette pathologie touche un tiers de la population mondiale. Selon les continents, 04 à 84 % des individus sont infectés, avec une prévalence très hétérogène selon les pays et varie essentiellement en fonction du niveau d'hygiène des populations et des habitudes alimentaires (Hoquet, 1979).

La situation en Algérie reste méconnue. La séroprévalence serait autour de 50% à travers plusieurs études réalisées au Centre et à l'Est. On note une diminution progressive du taux d'immunisation des femmes enceintes atteignant 54% en 1995 (Nouassria et Mezghiche, 20017).

Le diagnostic sérologique est basé sur l'étude des IgM et IgA spécifique, permettant un diagnostic de certitude et de préciser l'évolution de la maladie durant la grossesse. Un premier problème d'interprétation se pose parfois en présence d'un taux très faible d'IgG spécifique.

C'est dans ce contexte que nous proposons de conduire une étude de la séroprévalence par le diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale qui repose, en période prénatale sur un suivi sérologique des femmes qui sont non immunisées et aussi sur l'analyse de liquide amniotique, et en période néonatale avec des méthodes directes comme la recherche de *Toxoplasma gondii* dans le

placenta et le sang du cordon ombilical ainsi que la recherche de l'aspect épidémiologique de cette parasitose qui reste indispensable dans le suivi et le contrôle de l'infection.

Notre étude a pour objectif de situer le statut immunitaire des femmes enceintes prélevées au niveau de L'HCA Ain Nadja, (Hôpital Central de l'Armée).

1. Par la recherche des immunoglobulines antitoxoplasmiques IgG, IgM spécifiques par la technique ELFA, réalisé chez 393 patientes.
2. Une comparaison des profils sérologiques des couples mère-enfant et sérum-humeur aqueuse par la technique western blot, réalisée pour la confirmation des toxoplasmoses congénitale et oculaire.
3. Nous nous somme intéressées également à la recherche de *Toxoplasma gondii* dans le placenta et dans les liquides biologiques par PCR. Pour cela, nous avons mis au point une technique d'amplification génique (PCR) en utilisant le couple d'amorce JW62/JW63 et enfin en appliquant cette PCR sur des échantillons biologiques animales (brebis, chats) afin d'avoir l'apport de cette PCR dans le diagnostic épidémiologique de la Toxoplasmose.

CHPITRE I
RAPPELE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Définition

La toxoplasmose est une anthroponose cosmopolite, souvent latente chez l'enfant et adulte, mais redoutable chez le fœtus, le nouveau-né et le sujet immunodéprimé (**Gavin et al, 1993**).

Elle est due à un parasite intercellulaire obligatoire, *Toxoplasma gondii*, avec une prédilection pour les cellules du système réticulohistiocytaire (SRH)(**Nozais, 1996**).

Le chat et autres félinés en tant qu'hôte définitif, occupe une place centrale dans le cycle parasitaire par l'émission fécale et la dissémination importante des parasites dans l'environnement, en particulier dans le sol.

Les autres animaux, herbivores et carnivores, constituent en tant qu'hôte intermédiaire, un important réservoir animal, potentiellement contaminant pour l'homme (**Romand, 2002**).

II. Historique

- ✓ 1908 découverte à Tunis de *Toxoplasma gondii* par Nicolle et Monceaux uniquement sous sa forme tachyzoite dans les tissus d'un rongeur sauvage (le *cténodactylus gondii*) et simultanément au Brésil chez un lapin par Splendor en 1909
- ✓ 1909 : le parasite est nommé *Toxoplasma gondii* à partir du mot grec *toxon* qui signifie croissant ou arc.
- ✓ 1923 :Janku découvre le parasite dans des kystes rétinien d'un enfant hydrocéphale.
- ✓ 1937 : Wolf et Gowen rapportent le premier cas de toxoplasmose congénitale humaine et Sabin décrit la symptomatologie de la toxoplasmose humaine
- ✓ 1948 : Sabin et Feldman mettent au point le Dye test ou le test de lyse qui a permis le développement de l'approche immunologique et épidémiologique de la toxoplasmose.
- ✓ 1957 : La mise au point de l'immunofluorescence indirecte par Goldman et Kelen a facilité la quantification des anticorps antitoxoplasmiques.
- ✓ 1965 : Desmonts démontre le rôle de la viande mal cuite dans la transmission de la toxoplasmose à l'homme.
- ✓ 1970 : Hutchison et Frenkel mettent en évidence le cycle sexué du parasite chez son hôte définitif, le chat.
- ✓ 1972 : premier isolement de toxoplasmes par culture cellulaire à partir du sang d'un nouveau-né présentant une toxoplasmose congénitale grave.
- ✓ 1982 : le SIDA amène la toxoplasmose au premier rang des maladies opportuniste avec l'atteinte cérébrale principalement.

- ✓ 1989 : Burg publiait première application de la Polymérase Chain Réaction (PCR) pour la détection du toxoplasme, en prenant comme matrice le gène B1 et depuis, la PCR est proposée dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

III. Etude de l'agent pathogène

1. Taxonomie :

Toxoplasma gondii est un protozoaire à multiplication intracellulaire obligatoire (**Fortier, et al 1980**).

Embranchement	:protozoa (Goldfuss, 1918)
Phylum	:Apicomplexa (levine ,1970)
Classe	:Sporozoea (Leukart,1879)
Sous classe	: Coccidia (Leukart , 1879)
Ordre	:Eucoccididea(Léger duboseq , 1910)
Sous ordre	: Eimeridea (Léger, 1911)
Famille	:Sarcocystidae (Poche , 1913)
Genre	: Toxoplasma (Nnicolle et manceau , 1909)
Espèce	: Gondii

Le genre *Toxoplasma* ne comporte qu'une seule espèce, et les génotypes sont en nombre de trois : le génotype I, le génotype II, et le génotype III.

Le génotype II, qui est le plus fréquent, représente environ 80 % des isolats présents dans les laboratoires de références, contre 10% pour le génotype I et 5 % pour le génotype III (**Ajzenberg et al, 2000**). Pour ce qui est de la génopathogénicité, les souches de type II sont impliquées aussi bien dans les formes infracliniques que dans les formes graves avec mort fœtale, ceci est en fonction de l'âge gestationnel.

Pour les souches de type I , des toxoplasmoses congénitales graves peuvent être observées , comme il se peut que le toxoplasme soit présent dans le placenta mais n'entraîne aucune infection chez le fœtus .Le génotype III est toujours à l'origine de toxoplasmose congénitale graves (**Ajzenberg et al ,2002**).

Concernant les génotypes atypiques et recombinants, ils proviennent essentiellement de régions faiblement anthropisées. Chez l'homme, ou ce dernier semble intervenir d'une manière accidentelle, ils sont toujours associés a des toxoplasmoses symptomatiques.

2. Morphologie

T. gondii existe sous trois formes infectieuses, selon l'hôte et le stade infectieux considérés.

2-1. Le tachyzoite/trophozoite

Le tachyzoite, du grec *Tachos* qui veut dire rapide, est une forme arquée de 6 à 8 μm de long sur 3 μm de large. La partie postérieure est arrondie, présentant à sa moitié un noyau sphérique de 1 à 2 μm , la partie antérieure est affilée. Il est obligatoirement intracellulaire avec une affinité pour le SRH. Il représente la forme retrouvée pendant la phase aiguë de la maladie (Pester-Alexandre, 1993).

L'ultrastructure du parasite montre qu'il est formé d'un complexe membranaire, d'un complexe apical, d'un anneau polaire et de l'apicoplaste.

Le complexe apical se situant à la partie effilée, comprend le conoïde, les rhoptries, les micronèmes et les granules denses nécessaires à l'adhésion, la pénétration et la formation de la vacuole parasitophore à l'intérieur de la cellule hôte.

Le tachyzoite est une forme très fragile, détruite après 30mn à 50°C, après congélation à -20°C, après dessiccation et sous l'action du suc gastrique. (Affsa, 2005) (voir Figure 1)

2-2. Le kyste toxoplasmique

Le kyste toxoplasmique résulte de la transformation des trophozoites lors de l'évolution de l'infection dans l'organisme. C'est une forme de latence intra-tissulaire de 5 à 100 μm de diamètre. Il est sphérique dans les tissus nerveux, allongé dans les tissus musculaires et peut être retrouvé au niveau de l'œil et d'autres viscères.

Le kyste peut contenir plusieurs milliers de bradyzoites. Le mot bradyzoite découle du mot grec *brados* signifiant lent. Ils sont de structure très proche de celle des tachyzoites, mais plus petits et plus résistants (Tomavo, 2001 et 1995).

Le kyste est plus résistant que le tachyzoite. Il survit dans le suc gastrique et à une température inférieure à 60°C, mais il est détruit par la congélation pendant au moins trois jours, et à température supérieure à 67°C pendant 3 mn et partiellement inactivé par la cuisson à la micro-onde (Affsa, 2005) (Voir figure 2).

2-3. L'oocyste

L'oocyste est le résultat de la reproduction sexuée dans les cellules épithéliales du chat et d'autres félinés, il est émis dans les fèces sous forme diploïde et non sporulée. Sa paroi à double couche délimite un volume sphérique de 10 à 12 μm de diamètre.

La sporulation nécessite de 1 à 5 jours selon l'environnement et aboutit, après trois divisions cellulaires, à la formation de deux sporocystes ellipsoïdes de 6 à 8 μm de

diamètre, contenant chacun quatre sporozoites ,(c'est la forme infestante). (Moulinier ,2003).

Le sporozoite a une structure comparable à celle du tachyzoite , mais s'en différencie par l'abondance des micronèmes et des rhoptries (Moulinier. 2003)

Les oocystes sporulés résistent plus d'une année dans le sol humide, aux agents de désinfection dont l'eau de javel, et au suc gastrique. Ils sont par contre détruits à une température de 60°C pendant 1 mn et inactivé de façon incomplète par la congélation, (Affsa-toxoplasmose, 2005) (Voir figure 3).

Figure1 :Tachyzoite/ Trophozoite (Dubey,1998).

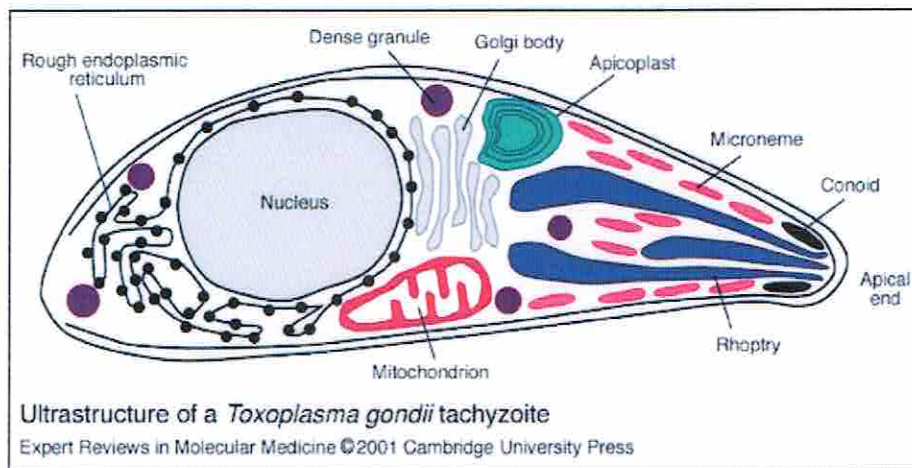
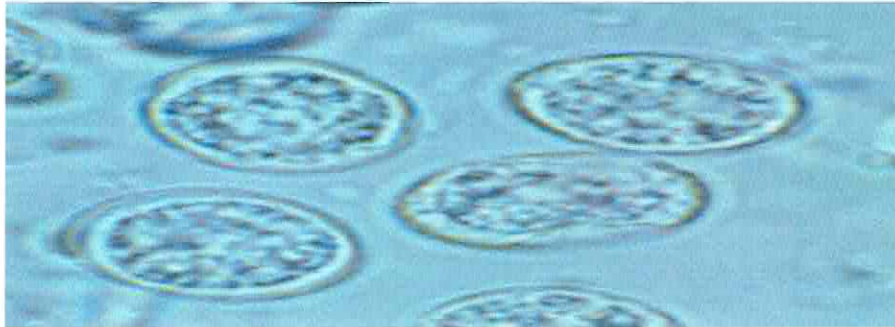


Figure 2 : Kyste de *Toxoplasma gondii*(Affsa-toxoplasmose,2005).



Figure3 : Oocyste de Toxoplasma gondii(Afssa-toxoplasmosse,2005)

2-3. Cycle évolutif

Trois phases sont à distinguer dans le cycle évolutif du toxoplasme :

- ✓ Une phase de reproduction ou phase coccidienne : au niveau des cellules entéro-épithéliales de l'intestin de l'hôte définitif ;
- ✓ Une phase libre ou de sporulation dans le sol ;
- ✓ Une phase proliférative chez les hôtes intermédiaires (oiseaux et mammifères y compris l'homme).

3-1. La phase coccidienne

L'évolution chez l'hôte définitif comprend notamment :

Une multiplication asexuée ou **schizogonie** résultant de l'infestation de l'hôte par les kystes présent chez les rongeurs ou oiseaux qu'il aurait dévorés ou bien à partir d'oocystes murs souillant le sol ou les végétaux.

Et en multiplication sexuée ou **gamogonie** qui se caractérise par la transformation des formes asexuées (tachyzoïtes) en gamétoctes mâles (microgamétoctes) et gamétoctes femelles (macrogamétoctes), il s'en suivra une fécondation qui aboutira à la formation d'oocystes non sporulés, non infectieux qui seront éliminés avec les selles de chat. L'émission des oocystes s'effectue cinq jours après ingestion des kystes et vingt jours après ingestion d'oocystes sporulés. (Dubey, 1998).

3-2. La phase libre

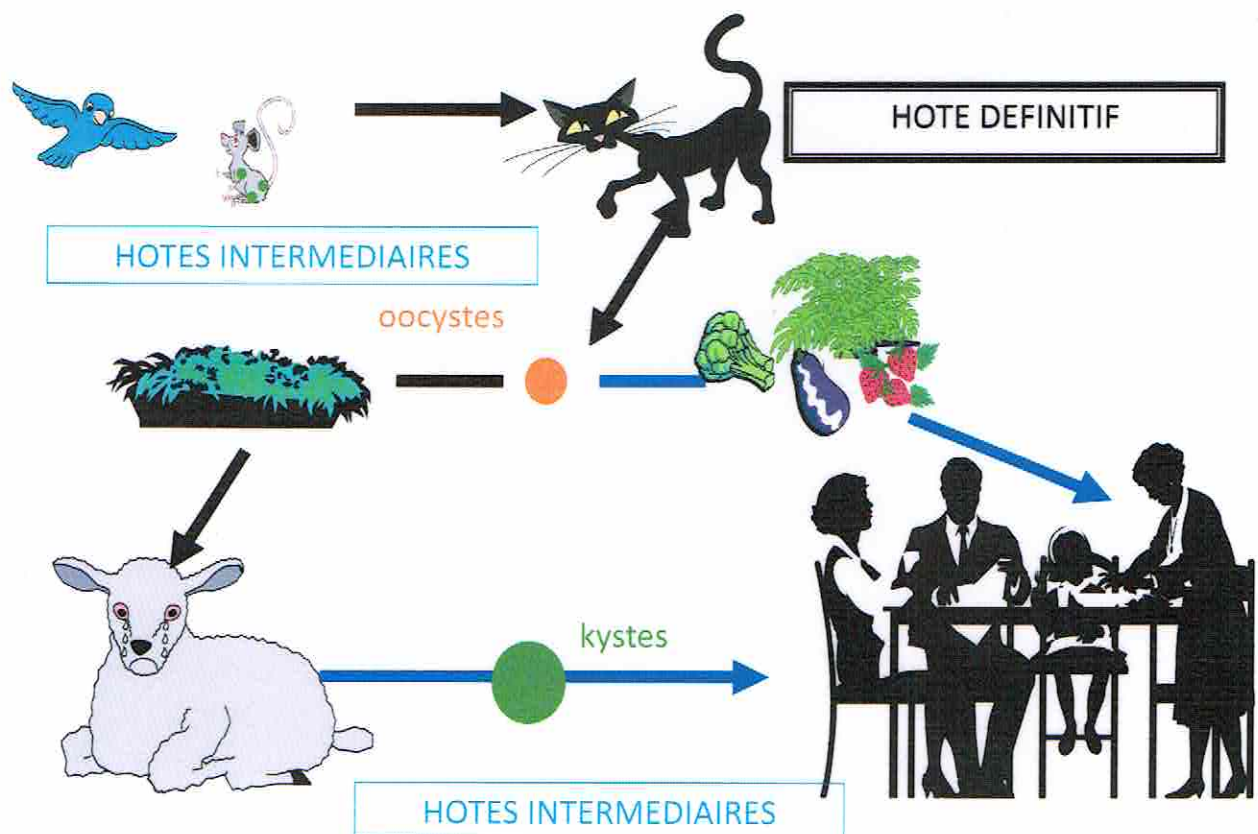
Dans le milieu extérieure, les oocystes deviennent infectieux en 1 à 5 jours, en fonction de l'humidité et de la teneur en oxygène, grâce à un processus appelé **sporogonie** qui aboutit à la formation de sporozoïtes. Ces derniers assureront la contamination tellurique des vertébrés (Pelloux, 1993).

3-3. La phase proliférative

L'ingestion des kystes ou des oocystes chez l'hôte intermédiaire entraîne au niveau du tube digestif la rupture de leurs parois puis la libération de bradyzoïtes ou de sporozoïtes, ces derniers gagnent les différents organes de l'hôte par le biais des macrophages et monocytes sanguins et lymphatiques, pénètrent dans les cellules et se multiplient par endodyogenèse. Les cellules hôtes éclatent et libèrent un grand nombre de tachyzoïtes qui infestent d'autres cellules. C'est la phase aiguë de la maladie ou toxoplasmose évolutive qui ne dure que 8 à 12 jours (Ripert, 1996).

Après une brève parasitémie et suite à l'apparition de phénomènes immunitaires, les parasites s'enkystent dans les tissus en particulier dans les muscles striés et le cerveau, et passent à l'état quiescent. C'est la phase chronique de la maladie. (Voir figure 4)

Figure 4 : Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* (Fortier et al, 2000).



4-Mode de contamination

➤ a. Contamination humaine

L'analyse du cycle de *Toxoplasma gondii* montre deux possibilités d'infection pour l'homme : une contamination exogène lors d'une primo-infestation et une réactivation endogène de parasites latents chez un sujet immunodéprimé.

4-1. La primo-infection :

L'homme peut s'infester par ingestion d'oocystes ou de kystes et par transfert de tachyzoïtes (**Dupouy et Gavinet 1993**).

✓ Par les oocystes

L'homme s'infeste indirectement par la consommation de crudités ou d'eau de boisson souillées par des déjections de chats ; après ingestion, les oocystes libèrent les sporozoïtes infectants.

Le contact direct avec le chat semble moins risqué que celui à sa litière ou les oocystes peuvent sporuler (**Dupouy et Gavinet, 1993**) .

✓ Par les kystes

L'homme s'infeste par ingestion de viande mal cuite (saignante) contenant des kystes de *toxoplasma gondii* ou par simple contact des mains ou des ustensiles de cuisine avec la viande crue. Ceci étant le principal mode de contamination. (**Dupouy et Gavinet ,1993**).

Les kystes présents dans un greffon (cardiaque, pulmonaire) peuvent également être source de contamination pour un receveur non immun.(**Chiquet et al ,2000**).

✓ Par les tachyzoïtes

Présents dans la circulation d'un hôte infecté, ils sont très peu résistants mais sont responsables de la contamination fœtale par voie transplacentaire.(**Chiquet et al ,2000**)

La contamination de receveurs non immuns par la greffe de moelle ou par le sang (accident de laboratoire) reste rare (**Dunn et al, 1999**).

4-2.Par réactivation endogène

En cas d'immunodépression, les kystes secondaires à une primo-infection peuvent être à l'origine de réactivation interne et donner de nouvelles manifestations parfois graves avec atteinte fréquente du système nerveux (**Marty et al, 2002**).

4-3. Par réinfestation

Des cas exceptionnels de réinfestation par des oocystes ont été décrits, en particulier chez la femme enceinte avec pour conséquence une toxoplasmose congénitale. (Gavinet et al, 1997).

➤ b- Contamination animale

T.gondii peut infester les animaux à sang chaud : les mammifères terrestres et marins, les oiseaux (Dubey et Beattie ,1988). Presque tous les animaux sont susceptibles de jouer un rôle D'HI excepté une observation faite sur une brème (Yakimoff, 1927) et qui n'a pas été confirmée par d'autres auteurs, seuls les poissons semblent être tous et toujours indemne de toxoplasmes ((Hans-Ann ,1982).

Le principale hôte définitif, le chat s'infeste très jeune, dès qu'il commence à chasser, La parasitose est rarement symptomatique et aboutit à une émission transitoire d'oocystes. Le chat est ainsi potentiellement infectant pour l'homme pendant quelques jours.

Chez les hôtes intermédiaires, le parasite ne subit pas de maturation et aboutit à une impasse parasitaire avec enkystement tissulaire asymptomatique.

L'infestation animale se produit à partir des oocystes de l'hôte définitif ou l'ingestion de viandes enkystées de divers animaux.

IV. Epidémiologie de la toxoplasmose

➤ a-Séroprévalence Humaine :

1. Prévalence de la toxoplasmose dans le monde :

La toxoplasmose touche un tiers de la population mondiale. Selon les continents, 04 à 84% des individus sont infectés. (Flegr et al, 2014).

En Amérique, la séroprévalence de la toxoplasmose est élevée dans la partie sud du continent avec un taux pouvant atteindre les (70%) à Cuba (Gonzalez-morales et al, 1995) et relativement faible dans la partie nord avec un taux de (22 %)aux USA. (Jones et al ,2001).

En Asie, on note un taux élevé pour l'Iran (51%) et la Malaisie (45%) (Nissapatorn et Noor Azmi ,2003) contrairement à l'extrême orient, à l'exemple de la Corée autour de (23 %), en Australie (Karunajeewa et al, 2001) (33%) en nouvelle Zélande. (Morris et Croxon, 2004).

En Europe, il existe trois zones différentes, la zone anglo-saxonne à séroprévalence modérée, estimée à (25%), la zone franco-allemande à séroprévalence élevée avec (40%) à (70%) et la zone méditerranéenne à séroprévalence de la toxoplasmose a longtemps été élevée, (82%) en 1960, (66%) en 1982, mais elle a diminué de façon régulière depuis 40 ans pour atteindre (54%) en 1995 et (44%) en 2003, avec des variations régionales. (Morris, 2004).

En Afrique, la séroprévalence est élevée dans les zones humides du nord, du centre et de l'Ouest avec un taux compris entre (40%) et (70%), Nigéria 75% (Onadeko et al, 1996), Cameroun 77% (Ndumb et al, 1992), et faible dans les zones désertiques avec un taux inférieure à (25%), Niger (18%) (Julvez et al, 1996).

Au Maghreb, la séroprévalence de la toxoplasmose est estimée à (58,4%) en Tunisie, (45%) en Lybie (Moussa et al, 2011) et 50,6% au Maroc. (El manssouri et al, 2007).

En Algérie, la séroprévalence tournait autour de (50%). l'ensemble des études menées nous ont permis de dresser un intervalle où la séroprévalence est comprise entre 10% (Balazet, 1955) et 57% (Bouchene, 1981) mentionné dans le (Tableau I) et (voir La figure 5 qui illustre le statut global de la séroprévalence de *Toxoplasma gondii* dans le monde)

Tableau I : Séroprévalence de la Toxoplasmose en Algérie.(Mezghiche et Nouasria,20017).

Référence	Année d'étude	Lieu d'étude	Séro prévalences
Balazet	1955	Alger	10 %
Lamari	1969 à décembre 1973	Alger	53,2 %
Schneider et Coll	1977	Alger	53,2 %
Bouchéne	Septembre 1978 à février 1981	Alger	57,71 %
Hassani	Janvier 1986 à décembre 1991	Alger	38 %
Bourouba et Kadour	Janvier 1991 à décembre 1992	Alger	44 %
Chellali et Benabdelmoumen	1993	Alger	40,75 %
Tiari	Octobre 1995 à juin 1996	Alger	41,88 %
Bouchéne ,Bachi et Gourbdji	Janvier 1998 à décembre 2001	Alger	46,57 %
Fendri	1999	Constantine	50,11 %
Messerer	2009	Annaba	47,8 %
Abidat ,Adjmi	2009	Alger	50,7 %
Chouchéne	2013	Sétif	32,6 %
Guechi ,Hamrioui	11/2013 à 03/2014	Alger	30,8 %
Yebbous Bensaid,Bachi	Janvier 2014 à décembre 2014	Alger	51,02 %
Belili ,Guechi,Hamrioui	Novembre 2014 à juin 2015	Alger	45 %

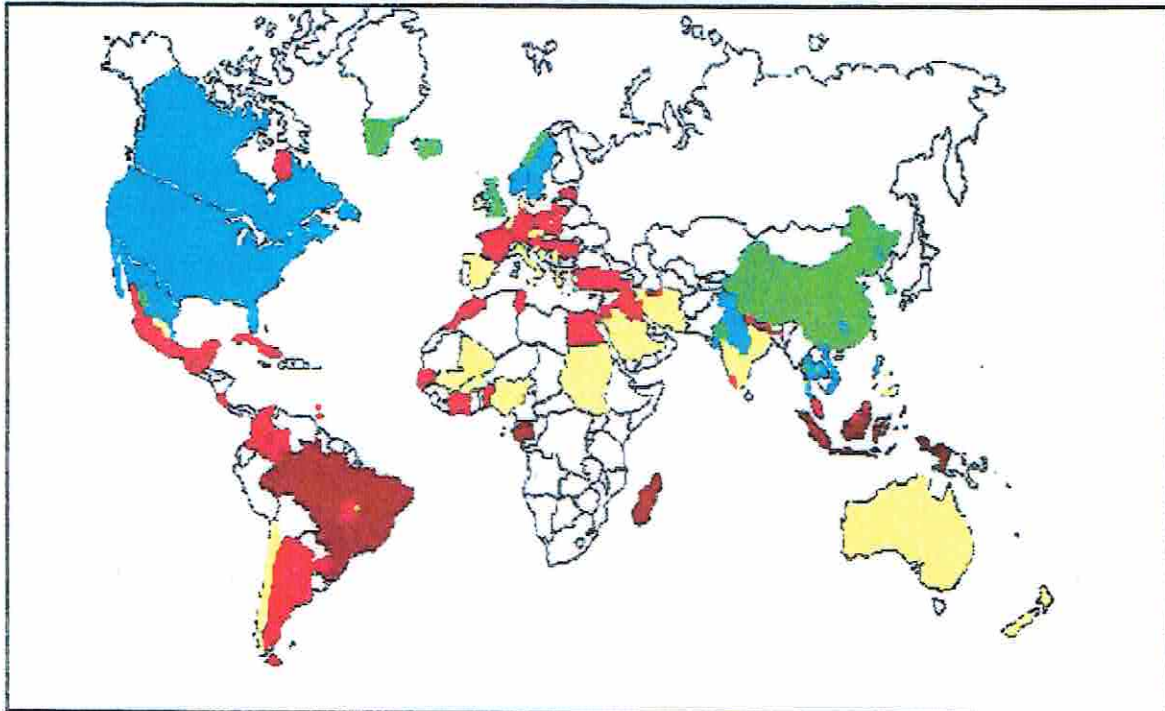


Figure 5 : Statut global de la séroprévalence de *T.gondii* dans le monde (Pappas al ,2009)

- ✓ Le rouge foncé correspond à une prévalence d'environ 60%
- ✓ Le rouge claire à 40-60%
- ✓ Le jaune à 20-40%
- ✓ Le bleu à 10-20%
- ✓ Le vert à une prévalence inférieure à 10%
- ✓ La couleur blanche indique l'absence de données.

➤ b- Séroprévalence animale :

La séroprévalence exacte est mal connue car elle varie selon la région et selon les tests diagnostique utilisés, mais on suppose qu'environ 70% des chats d'Europe Occidentale sont séropositifs et seulement 1% excréterait des œufs dans les selles (**Hans et Ann , 1982**).

La mise en œuvre de méthodes de dépistage sérologique permettant d'évaluer la fréquence de l'infection toxoplasmique chez les animaux et surtout la découverte simultanée en 1970 (par Dubey et frenkel d'une part, Hutchison, Slim et Work d'autre part), du cycle biologique du parasite ,permettent aujourd'hui d'avoir une idée beaucoup plus précise de l'importance réelle de cette maladie en pathologie animale et de comprendre le rôle des animaux ,notamment du chat, dans le maintien de la propagation de l'infection(**Weyers et Marchand ,1977**).

Les recherches épidémiologiques sont fragmentaires ,et il n'existe que peu de résultats à valeurs statistique étant donné l'énorme travail que représente l'isolement des souches à partir des séries importantes d'animaux ainsi que le contrôle sérologique des souris inoculées.

La plus part des auteurs se sont contentés d'aborder l'épidémiologie par l'étude sérologique et non par l'isolement du parasite ; on n'a donc souvent qu'une idée du nombre d'animaux qui ont subi un contact immunisant avec le parasite ; mais non de ceux qui l'hébergent à l'état vivant dans des kystes ou des pseudos kystes.

Work(1969) étudiant une population de 954 chiens et 184 chats, trouve 42%des chiens et 62,5% des chats ayant un TLT test de lyse du toxoplasme)

Les chiens âgés sont plus souvent positifs que les jeunes. Chez les chats au contraire l'âge ne semble pas intervenir.

Chez les bovins et les chevaux, le pourcentage de séroconversion est relativement faible. **Desmond (1962)** a rapporté un pourcentage de 4% chez les bovins, 9% des chevaux.

La bête bovine n'est pas fréquemment porteuse de toxoplasme ; il remarque qu'il est très difficile d'isoler le parasite de la viande du bœuf et l'expérimentation faite sur 18 bovins belges mène a la même conclusion. Par contre , la rétine permet d'isoler des toxoplasmes chez le bœuf dans 24% des cas.Cet organe (rétine) reste un lieu d'élection pour Ces parasites chez le porc, le cheval et le chat (**Mayer, 1962**).

Chez le mouton la contamination est courante. Lors d'une étude sérologique trouve 72% des individus positifs (**Desmond ,1960**).(Hans, 1975) isola 7 souches sur 12 moutons abattus pour la consommation humaine à Bruxelles.

IV. Physiopathologie et immunité anti-toxoplasmique

1. Pathogénie de la toxoplasmose

Après ingestion, la paroi des kystes ou des oocystes est lysée, ce qui permet de

Libérer les parasites dans les cellules de la muqueuse intestinale. Après multiplication active, les tachyzoïtes libérés diffusent par voie sanguine et lymphatique et sont ainsi disséminés dans les tissus (y compris dans le placenta et chez le fœtus, si la primo-infection a lieu lors de gestation). La durée de cette parasitémie est mal connue et dépend de la souche infectante. La mise en place de la réponse immunitaire entraîne l'enkystement du parasite. des kystes contenant des bradyzoïtes peuvent se former dans tous les organes , on retrouvera toutefois plus de kystes dans les organes possédant des cellules à longue durée de vie ou moins exposées à la réponse immunitaire telles que le myocarde , les cellules squelettiques , le cerveau et l'œil (**Flori et al ,2002**).

La fréquence et la gravité du risque fœtal au cours de la toxoplasmose évolutive maternelle varie selon l'âge de la grossesse et la précocité de la thérapeutique. Plus le terme de la grossesse est

avancé, plus le risque d'infection fœtale augmente. A l'inverse, la gravité de la fœtopathie décroît au fur et à mesure que l'âge de la grossesse avance (Dunn et al , 1999).

La période la plus dangereuse se situe entre la dixième et la vingt-quatrième semaine, ceci est lié au développement de la structure et de l'irrigation placentaire facilitant ainsi le passage du parasite ainsi qu'à l'immaturité fœtale.

Les lésions dues à la prolifération des tachyzoïtes constituent des foyers de nécrose périventriculaire ou entourant l'aqueduc de Sylvius, associant vascularité, thrombose et calcification. Ces lésions sont secondairement responsables d'hydrocéphalie par obstruction de l'aqueduc du Sylvius.(Forestier et al , 1992).

2. La réponse immunitaire

Lors d'une infection par *Toxoplasma gondii*, une immunité spécifique de type cellulaire principalement, se met en place. Les macrophages sont les premiers effecteurs de cette réponse immunitaire. Ils produisent de l'interleukine 12 IL-12 et du TNF. L'IL-12 active les cellules Natural killer (NK) et les lymphocytes T qui produisent de L'INF γ . L'INF γ et le TNF agissent ensuite en synergie pour détruire les tachyzoïtes présents dans les macrophages (Jones et al ,2001).

L'infection par *Toxoplasma gondii* induit également une réponse humorale entraînant la production d'anticorps. Les IgM sont produits environ une semaine après contamination et persistent au maximum un an, elles sont donc les témoins d'une infection récente. Les IgG sont produites secondairement, une à deux semaines après la contamination et persistent durant toute la vie de l'individu. Les IgA sont les anticorps protecteurs produits au niveau des muqueuses, elles ont un rôle particulièrement important dans la limitation de l'infection des anthérocytes par le toxoplasme. La mise en place de cette réponse immunitaire permet de lutter contre la prolifération du parasite et contre une réinfection, mais ne permet pas d'empêcher la formation de kystes tissulaire (Kasper et al ,2004).

V. Clinique

Deux formes cliniques sont à distinguer :

- ✓ La toxoplasmose acquise
- ✓ La toxoplasmose congénitale

1. La Toxoplasmose acquise

Bénigne voir inapparente chez le sujet immunocompétent, la toxoplasmose acquise peut être redoutable et peut prendre des formes très graves chez l'immunodéprimé (Ripert ,1996).

Les formes inapparentes ou sérologiques sont les plus fréquentes, elles sont asymptomatiques et leur découverte est souvent fortuite lors d'un bilan prénuptial ou prénatal, se traduisant par une sérologie positive (Tenter et al, 2000).

Néanmoins, des formes sévères associées à la toxoplasmose ganglionnaire, viscérale, neurologique ou oculaire peuvent être observées chez l'immunocompétent (**Chandenier et al,2000**) .

2. Toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale se traduit par une parasitémie qui fait suite à une contamination de la femme au cours de la grossesse.

Le risque varie en fonction du terme de la grossesse lors de la survenue de l'infection toxoplasmique. En effet, plus le terme est avancé, plus le risque de passage transplacentaire du parasite est élevé mais moins les lésions seront graves ou, au contraire si la grossesse est à ses débuts, le risque de passage transplacentaire est moindre mais les conséquences sont graves (**Dunn et al ,1999**).

En fonction de l'âge de la grossesse, on distingue trois formes de toxoplasmose congénitale (**Bessiére et al ,2008**) .

2-1.Toxoplasmose du premier trimestre

Elle est responsable de la toxoplasmose congénitale majeure. Cette forme grave entraîne :

- ✓ Soit la mort in *utéro*.
- ✓ Soit une encéphalomyélite toxoplasmique au pronostic péjoratif chez l'enfant à naître

On décrit classiquement 4 groupes de signes cliniques.

- ✓ Macrocéphalie avec hydrocéphalie externe (**voir figure 06**)
- ✓ Signes neurologique variés avec des convulsions généralisées, des troubles du tonus.
- ✓ Des calcifications intracrâniennes presque pathognomoniques.
- ✓ Des signes oculaires : Microphthalmie, Strabisme, Chorioretinite pigmentaire musculaire uni ou bilatérale (**voir figure 7 et 8**).

Devant un tel tableau clinique, la mort du nouveau né se fait dans les premiers mois de vie. En cas de survie, l'enfant est atteint de retard psychomoteur considérable (**Bessiére et al ,2008**).

2-2.Toxoplasmose du deuxième trimestre

Elle est caractérisé par un syndrome infectieux néonatal avec une atteinte multi-viscérale sévère ; l'enfant est hypotrophique et présente un ictère néonatal, un syndrome hémorragique et une hépatosplénomégalie ; des signes oculaires ou neurologiques peuvent être également observés. Si l'évolution n'est pas fatale, l'enfant est exposé a des lésions nerveuses irréductibles (**Bessiére et al ,2008**) .Les formes infracliniques ou bénignes sont fréquentes.

2-3.Toxoplasmose du troisième trimestre

Le nouveau-né présent une symptomatologie poly viscérale extraneurale .on peut observer un ictère néonatal généralement réversible, accompagné d'hépto-splénomégalie ou des lésions oculaire isolées.

Mais la forme la plus fréquente est la toxoplasmose congénitale infraclinique (80% des cas).l'enfant est porteur de kystes dans le névraxe ou la rétine et la maladie est susceptible de s'exprimer secondairement. (Bessiére et al, 2008)

Figure 6 : Photo d'un nouveau-né présentant une hydrocéphalie due à une toxoplasmose congénitale (Dubbey et Beattie, 1988).

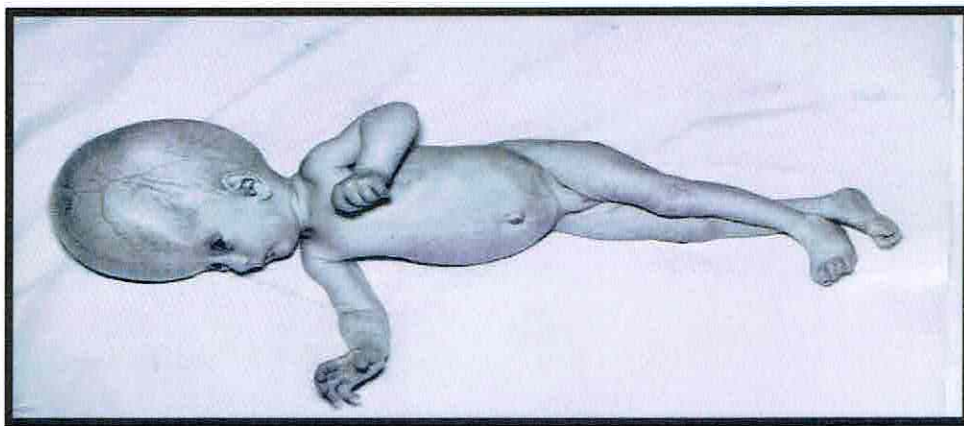


Figure 7 : Lésions toxoplasmiques récentes sur fond d'œil (Macleod, 1999).

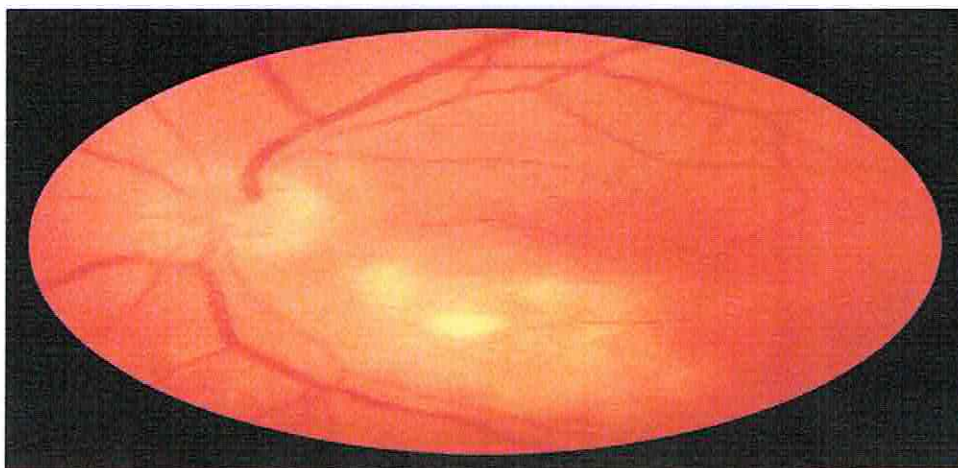
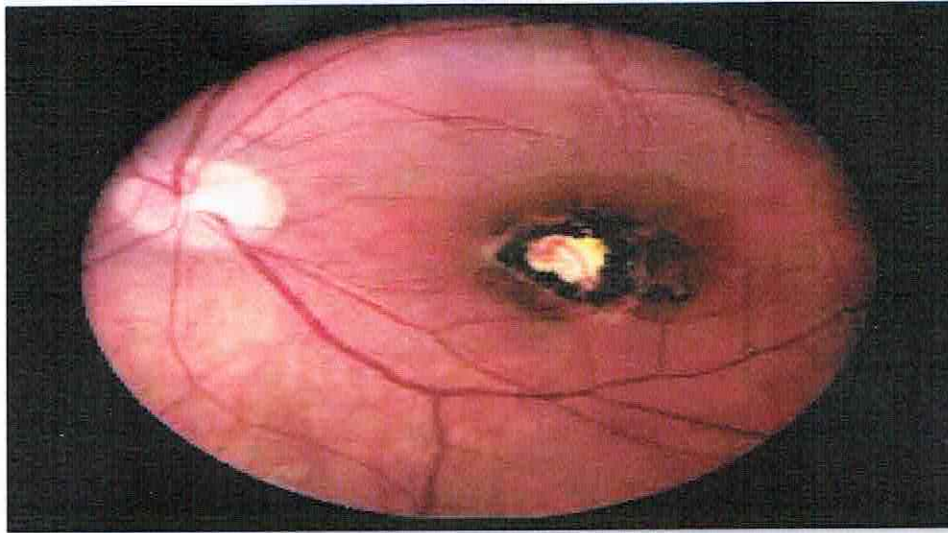


Figure 8 : Lésion toxoplasmiques cicatricielles sur fond d'œil (Roberts et Macleod, 1999).



VI. Diagnostic

Selon le contexte clinique et radiologique, le diagnostic biologique de la toxoplasmose repose sur l'isolement du parasite ou de l'ADN parasitaire et/ou la mise en évidence des anticorps spécifiques dirigés contre le parasite.

1. Diagnostic parasitologique

La recherche de *Toxoplasma gondii* est difficile et peu pratiquée, c'est le diagnostic immunologique qui est le plus utilisé. La recherche du parasite devient indispensable lorsque les techniques sérologiques n'apportent pas d'arguments diagnostiques suffisants

Pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, les prélèvements à traiter sont le liquide amniotique, le sang du cordon ombilical et le placenta.

1-1. Examen direct

Cet examen permet de mettre en évidence les tachyzoïtes ou les kystes après coloration au MGG, par l'utilisation de l'immunofluorescence directe ou par l'immunocytochimie. Néanmoins, la sensibilité de cet examen est aujourd'hui considérée comme médiocre, essentiellement en raison de la rareté des parasites sur les frottis (Golvan et Ambroise, 1990).

1-2. Inoculation à l'animal

Une technique réalisée dans les laboratoires spécialisés, elle consiste à inoculer à l'animal (souris, lapin) un échantillon du prélèvement pathologique. La révélation de l'existence des toxoplasmes

dans l'échantillon inoculé ne peut être détectée qu'après 3 à 4 semaines par la mise en évidence d'une synthèse d'anticorps et confirmée par la présence de kystes dans le cerveau.

L'inoculation à la souris fournit donc des résultats tardifs, mais elle conserve des avantages majeurs : une bonne sensibilité, une spécificité de 100%, une confirmation objective des résultats de la biologie moléculaire. En outre, elle permet l'isolement des souches pour une caractérisation ultérieure.

1-3. Culture cellulaire

Cette technique permet la mise en évidence des parasites sur des cellules fibroblastiques MRC5 ou des monocytes THP1. La révélation des toxoplasmes obtenus par culture se fait après quatre jours par coloration au Giemsa, ou par immunofluorescence.

Elle est relativement rapide par rapport à l'inoculation à la souris mais sa sensibilité est médiocre comparé aux techniques actuellement utilisées qui ont fait qu'elle soit de moins en moins pratiquée. (Hitt et Filice, 1992).

1-4. Biologie moléculaire

Elle permet la mise en évidence de l'ADN parasitaire qui sera amplifié par la technique PCR (Polymérase Chaîne Réaction). C'est une technique très sensible et dotée d'une spécificité optimale, ce qui la rend plus avantageuse que les autres techniques précédemment citées.

Les applications de la PCR pour le diagnostic d'une infection toxoplasmique concernent principalement le diagnostic anténatal. (Romand et Thulliez, 2003).

2- Diagnostic sérologique

C'est la recherche des anticorps qui est la plus utilisée pour le diagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte.

Les techniques les plus utilisées pour déterminer le statut sérologique d'une femme enceinte sont les techniques immunoenzymatiques, d'immunocapture et d'immunofluorescence. Les isotypes d'immunoglobulines recherchés sont les IgM et les IgG, parfois les IgA (Golvan et Thomas, 1990).

2-1. Source d'antigène

Les techniques usuelles utilisent différentes sources d'antigène :

- ✓ Les antigènes figurés représentés par le toxoplasme en entier, vivant ou fixé. Ils sont obtenus à partir d'ascite de souris inoculées avec la souche RH de sabin. Les anticorps détectés par ces techniques sont dirigés contre les antigènes membranaires,
- ✓ Les antigènes solubles composés d'extraits de trophozoites plus ou moins purifiés. C'est un mélange d'antigènes cytoplasmiques et membranaires obtenus également à partir de souche

RH de *Toxoplasma gondii* après traitement physico-chimique des parasites (broyage, congélation, décongélation, ultrasonication et lyse osmotique du parasite).

2-2. Technique utilisant l'antigène figuré

2-2.1 Dye test

C'est la technique de référence, et la première à avoir été appliquée dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose. Elle a été mis au point en 1948 par **Sabin** et **Feldman** et modifiée par **Desmonts en 1955**.

C'est un test de lyse reposant sur le principe de la cytotoxicité médiée par les anticorps et le complément. Elle consiste à mettre en présence une suspension de toxoplasme vivant avec le sérum à tester, auquel est ajoutée une source externe de complément. Le résultat de la réaction est déterminé par la lecture au microscope de contraste. Il apparaît lors d'une réaction positive, des parasites lysés par les anticorps de couleur grisâtre alors que dans une réaction négative, les parasites non lysés apparaissent réfringents.

- ✓ Le test est considéré comme positif lorsque 50% des parasites ont été lysés.
- ✓ Le titre est exprimé en UI/mL par comparaison avec le sérum étalon.
- ✓ C'est une méthode simple et très sensible à 2 UI/mL. Néanmoins, elle ne permet pas de tirer séparément les IgG et le IgM et nécessite une source externe de complément qui doit être dépourvue d'anticorps anti toxoplasme, en plus d'entretien des souches de *T.gondii*.

2-2-2 L'immunofluorescence indirecte (IFI)

Décrite par Goldman en 1957, cette technique utilise des tachyzoites formolés et fixés sur une lame à puits auxquels on ajoute le sérum à tester à différentes dilutions. On révèle ensuite les Ac fixés sur cet antigène grâce à l'ajout d'antiglobuline anti IgM ou anti IgG (dans ce cas-là, on parle de test de Rmington) marqué à l'isothiocyanates de fluorescéine. La lecture au microscope à fluorescence permet d'établir un titre correspondant à la dernière dilution pour laquelle, l'intégralité de la membrane des parasites apparaît bien à la fluorescéine. La lecture au microscope à fluorescence permet d'établir un titre correspondant à la dernière dilution pour laquelle, l'intégralité de la membrane des parasites apparaît bien fluorescente.

Cette technique présente les avantages d'être précoce, simple et peu coûteuse mais elle semble moins sensible et moins spécifique.

2 2-3 Agglutinations

Le principe est de co-incuber des dilutions de sérum avec des suspensions de toxoplasmes tués dans des microplaques de titration.

Une réaction positive est matérialisée par un voile formé au fond de la cupule et une réaction négative par un bouton de sédimentation.

- agglutination direct classique
- agglutination sensibilisée
- ISAGA (Immuno-sorbent Agglutination Assay) :

Cette dernière repose sur le principe d'immunocapture des Ac. Elle est appliquée pour la mise en évidence des IgM ,IgA,IgE.

Elle offre de nombreux avantages par sa sensibilité et sa simplicité, et elle n'est pas influencée par le facteur rhumatoïde. Cependant, la lecture est souvent difficile en raison de sa haute sensibilité aux IgM résiduelles.

2-3 Technique utilisant l'antigène soluble

2-3.1 ELISA direct

Décrite par Engvall et Parlmann en 1972. Les anticorps antitoxoplasmiques contenus dans le sérum à tester sont mis en contact avec des cupules sensibilisées par un antigène à dominance cytoplasmique, enrichie d'antigène membranaire, puis révélés par une anti-immunoglobuline humaine marquée à une enzyme (peroxydase), l'addition du substrat-chromogène spécifique de l'enzyme génère une réaction colorée dont la densité optique est mesurée par spectrophotométrie et est comparée à une gamme étalon de sérum titrés.

C'est une technique automatisée, reproductible avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Elle permet de révéler les différentes classes d'immunoglobulines.

2-3.2 ELISA réverse et double sandwich

La première étape est une immunocapture de l'isotype à étudier, le support est sensibilisé par un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-IgM ou anti IgA. Le sérum est ensuite ajouté et les anticorps correspondants sont captés sur le support. Après lavage, l'antigène toxoplasmique est ajouté, soit directement marqué à une enzyme (ELISA reverse) ou couplé aux anticorps marqués à une enzyme (ELISA double sandwich) L'ajout de substrat –chromogène révèle une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifique retenue dans les cupules. On obtient des index de fixation permettant une évaluation semi-quantitative de la présence des anticorps.

Ces techniques présentent l'avantage d'éviter l'interférence des IgG par compétition et du facteur rhumatoïde mais leur inconvénient majeur est de ne permettre qu'une évaluation semi-quantitative du taux d'anticorps (**Schefer et al, 1989**).

2-4 Technique complémentaires

Les techniques complémentaires sont très utiles pour dater l'infection (cas du test d'avidité) ou pour mieux caractériser une réponse immunitaire (cas du test de Western Blot)

2-4.1 Test d'avidité

L'étude de l'avidité des IgG qui mesure l'intensité de la liaison Ag-Ac, a été mise au point par Hedman et al en 1989 pour améliorer le diagnostic de la toxoplasmose et particulièrement pour faciliter la datation de la contamination par rapport à l'âge de la grossesse chez la femme enceinte.

L'avidité des IgG augmente au cours de la maturation de la réponse immunitaire humorale pour atteindre une valeur stable ; ainsi une avidité élevée est associée à une infection ancienne.

2-4.2 Western Blot (WB)

Introduit dans le diagnostic par (**Towbin et al, 1979**), il représente une méthode analytique extrêmement performante qui permet de séparer les fractions les plus spécifiques de la mosaïque antigénique par une électrophorèse pratiquée.

Cette technique est utilisée pour comparer le profil des Ac du sérum de la mère à l'accouchement avec celui de son enfant. Cette comparaison permet de distinguer les Ac maternels transmis et des Ac néo-synthétisés par l'enfant, et de poser le diagnostic de toxoplasmose congénitale le plus précocement possible. Elle permet également de différencier la réponse en anticorps dans deux milieux biologiques différents, sérum/LCR, au cours de la toxoplasmose cérébrale et sérum/humeur aqueuse, au cours de la toxoplasmose oculaire.

3- conduite diagnostique de la toxoplasmose:

3-1.Evolution de la cinétique des anticorps :

➤ Les IgM :

Les premiers anticorps synthétisés au cours de la primo-infection toxoplasmique, ces immunoglobulines sont produites dès la première semaine. 8 à 10 jours après la contamination, elles augmentent jusqu'au premier mois puis diminuent progressivement et disparaissent en règle générale après le troisième mois post infection. Cependant, elles peuvent persister sous forme résiduelle.

➤ **Les IgG :**

Elles ont une ascension plus lente, ce sont des IgG dirigées contre la membrane parasitaire qui sont synthétisées en premier, elles sont détectées environ une semaine après les IgM. Elles vont augmenter pour atteindre un pic vers le troisième mois post-infection. Elles se maintiennent à ce pic pendant trois mois environ puis diminuent progressivement à un taux résiduel au bout d'un an.

➤ **Les IgA :**

Elles ont une cinétique d'apparition intermédiaire entre ces deux premières cinétiques et disparaissent en général après un an. Leur recherche n'est pas systématique en matière de diagnostic, du fait de leur présence inconstante, mais peut être intéressante pour différencier une infection aiguë d'une infection chronique.

➤ **Les IgE :**

Leur synthèse est fugace et inconstante en cas de primo-infection, mais elles constituent un facteur de mauvais pronostic chez le nouveau né (**Bessièrres et al, 2008**), (**voir annexe0 2**).

3-2. Diagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte

le diagnostic sérologique de la Toxoplasmose chez la femme enceinte basé sur l'étude de deux prélèvements espacés de trois à quatre semaines.

Les différentes situations à envisager et leurs interprétations figurent dans l'algorithme suivant (**Bessièrres et al, 2008**) (**voir Annexe 03**).

3-3. Diagnostic de la toxoplasmose congénitale :

Toute toxoplasmose maternelle acquise pendant la grossesse expose le fœtus au risque d'infection par transmission transplacentaire des tachyzoïtes. le diagnostic est réalisé *in utero* et /ou après la naissance.

3-3.1 Diagnostic anténatal :

Il est nécessaire d'effectuer le diagnostic anténatal lors d'une séroconversion au cours de la grossesse par examen échographique pour évaluer le niveau de croissance du fœtus et de déceler d'éventuelles séquelles après contamination par *T.gondii*. (**Villena et al, 2003**).

Un examen parasitologique de certitude peut être demandé, il s'agit de l'amniosynthèse qui peut être réalisé à partir de la 18ème semaine d'aménorrhée en cas de suspicion de toxoplasmose évolutive. Le diagnostic se fait par la recherche de L'ADN toxoplasmique par la PCR.

3-3.2 Diagnostic néonatal :

Tous les enfants nés de mère suspectée d'avoir fait une toxoplasmose durant sa grossesse, sont soumis à un dépistage dès leur naissance, que le résultat du diagnostic soit positif ou négatif.

A la naissance, les prélèvements à effectuer systématiquement, comprennent d'une part, un fragment du placenta (100-200 g) et du sang du cordon pour la mise en évidence du toxoplasme et d'autre part, un prélèvement sanguin de l'enfant et de la mère pour la détection d'une synthèse d'anticorps spécifiques.

Les diverses techniques de recherche du toxoplasme (PCR) peuvent être appliquées à ces prélèvements. La sensibilité de la détection du toxoplasme dans le placenta pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale est de l'ordre de 60 à 70 % (**Fricker-Hidalgo et al ,1998**). Elle diminue à 25 % lorsque l'enfant a été traité *in utero*.

Le diagnostic immunologique repose sur la détection d'anticorps synthétisés par l'enfant. Les anticorps de classe IgM ou IgA ne traversant pas la barrière placentaire contrairement aux anticorps IgG, sont les meilleurs témoins de l'infection congénitale. Leur recherche doit reposer sur des techniques très sensibles basées sur le principe de l'immunocapture.

La recherche des IgG spécifiques néo-synthétisées par l'enfant repose sur des techniques qualitatives d'immunoblot avec comparaison des profils d'anticorps IgG de la mère et de l'enfant. Ces techniques peuvent également être appliquées à la détection des IgM ou des IgA, voir des IgE.

En combinant les techniques détectant les différents isotypes spécifiques, le diagnostic de la toxoplasmose congénitale est porté dans 96 à 98% des cas au cours des trois premiers mois de vie (**Pinon et al ,2001**).

3-3.3 Diagnostic post natal

Même en cas de négativité du diagnostic à la naissance, la surveillance sérologique de l'enfant est poursuivie .Les éléments en faveur d'une toxoplasmose congénitale seront alors :

- 1- L'apparition d'IgG spécifiques néo-synthétisés par l'enfant (test ELISA)
- 2- L'ascension ou l'absence de diminution du taux des anticorps IgG au cours de la première année de vie. En l'absence de toxoplasmose congénitale, les anticorps maternels disparaissent en 5 à 10 mois, en fonction du taux initial (**Gagneux et Kieffer , 2001**).

VII. Traitement de la Toxoplasmose

1-Chez l'homme

Les médicaments utilisés dans le traitement de la toxoplasmose se regroupent en deux grandes familles, les macrolides et les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique. Tous ces médicaments sont inactifs sur les kystes et n'agissent que sur les tachyzoïtes.

- ✓ Les macrolides Ex : *la spiramycine* pour le traitement de toxoplasmose acquise au cours de la grossesse, les macrolides de la nouvelle génération la roxitromycine,

l'azithromycine et la clarithromycine qui ont des propriétés pharmacocinétiques remarquables.(**Chang et Pechère ,1988**).

- ✓ les inhibiteurs de synthèse de l'acide folique : Ex :la *pyriméthamine*,cet antipaludéen de synthèse agit par inhibition de la déhydrofolate réductase. Utilisé comme traitement curatif et prophylactique, caractérisé par une bonne diffusion tissulaire placentaire et méningée (utilisé avant la 7^{ème} semaine de grossesse vu la possibilité d'un risque tératogène.
 - la triméthoprimine qui est active sur les *Toxoplasma gondii*
 - Les sulfamides, Ex : *La sulfadiazine* et le *Sulfamethoxazole*

VIII. Prophylaxie :

1- Prévention primaire :

Elle s'applique aux femmes enceintes séronégatives afin d'éviter le risque de séroconversion (**Kravetz et Federman , 2005**). Elle associe un suivi sérologique mensuel pendant toute la grossesse et une semaine après l'accouchement ainsi que des recommandations hygiéno-diététiques qui sont les suivantes :

- ✓ Lavage soigneux des crudités et des salades ;
- ✓ Cuisson suffisante des viandes (à plus de 65°C) ;
- ✓ Lavage des mains avant et après toute manipulation des aliments ;
- ✓ Nettoyage des ustensiles et surface ayant servi à la préparation des aliments ;
- ✓ Port de gants pour le nettoyage de la litière du chat, ainsi que pour les travaux de jardinage.

2- Prévention secondaire :

Chez la femme enceinte, le but est de :

- ✓ Limiter les conséquences en cas d'échec de la prévention primaire (séroconversion) ;
- ✓ Instaurer le plus rapidement possible un traitement pour limiter la transmission materno-fœtal ;
- ✓ Faire un diagnostic néonatal pour pallier aux conséquences d'un passage transplacentaire avec un traitement plus adapté (**Hohlfeld , 1999**).

3. Rôle du praticien vétérinaire dans le contrôle de l'infection toxoplasmique humaine

Avant d'envisager une quelconque intervention chez l'animal, une donnée préalable est indispensable : les résultats des examens sérologiques chez la femme enceinte (au minimum 2 examens à 21 jours d'intervalle)

Trois possibilités à envisager :

- 1ère possibilité : un titre en anticorps faible et stable dans le temps.
Ces résultats indiquent l'existence d'une infection chronique stabilisée. Les risques d'une surinfection de la mère et la contamination au fœtus est alors pratiquement nulle.
Le contact avec le chat est, dans ces conditions, dépourvu de danger.
- 2ème possibilité : un titre en anticorps élevé ou augmente avec le temps.
Ces résultats révèlent une infection évolutive ou récente de la femme gestante. Le fœtus risque alors d'être contaminé et le problème n'est pas de la compétence du praticien vétérinaire.
- 3ème possibilité : l'absence d'anticorps.

L'absence d'anticorps indique l'absence d'infection toxoplasmique chez la mère, qui risque de contracter la maladie durant la grossesse et d'infecter secondairement son fœtus. Il existe alors un danger réel de contamination par l'intermédiaire du chat.

Procéder à la recherche d'infection toxoplasmique chez le chat par deux types d'examens.

La recherche d'anticorps (au minimum 2 examens sérologiques à 10 ou 15 jours d'intervalle) et la recherche d'oocyste dans les fèces.

4. La vaccination

Différents objectifs vaccinaux sont à l'étude chez l'animal.

Ainsi l'infestation par la souche T263 du chat permet une immunité digestive locale, sans production d'oocystes.

Un vaccin vivant (souche S48 de *T.gondii*) a été développé chez la brebis et permet lors d'infection expérimentale une viabilité de 72 à 80 % des agneaux issus des mères vaccinées contre 18 % pour les mères témoins non vaccinées (**Buxton et al, 1991**).

Des souches n'induisant pas d'infection chronique (S48) sont utilisées pour la vaccination d'animaux d'élevage. Il s'agit d'un vaccin vivant S48 (**Ovilis Toxovax**) approuvé chez la brebis et testé chez la chèvre en conditions expérimentales (**Chartier et Mallerau, 2001**).

CHAPITRE II
MATERIELS ET METHODES

II-Matériels et méthodes :

II-1-Matériels :

II-a-Matériels non biologiques :

- **Matériels utilisés pour la technique Enzym Linked Fluorescence Assay (ELFA)**

- ✓ **Appareillage**

- Automate VIDAS
- Ordinateur

- ✓ **Consommable**

- Tubes gélosés
- Embouts jetables
- Portoir
- Clinipettes

- ✓ **Coffret VIDAS Toxo IgG II (BioMérieux SA)**

- **Matériels utilisés pour la technique Immuno Western-Blot (WB)**

- ✓ **Appareillages**

- Appareil Western blot
- Hôte
- Cuve d'incubation
- Agitateur électrique (Vortex)
- Règle plate transparente

- ✓ **Consommables**

- Gants en latex
- Embouts jetables
- Papier absorbant
- Papier aluminium
- Eau distillée
- Micropipettes à différents volumes

- ✓ **Coffret Toxoplasma Western blot IgG IgM (LDBIO Diagnostics)**

- **Matériels utilisé pour la technique PCR (Polymerase Chain Reaction)**

- ✓ **Appareillages**

- Hôte à UV
- Ultracentrifugeuse
- Centrifugeuse
- Bain-marie

- Etuve
- Termocycleur
- Cuve à migration
- Support de coulage/ peigne
- Microonde
- Camera, appareil à photos
- ✓ **Consommables**
 - L'eau physiologique
 - Ethanol absolu
 - Agarose
 - Phosphate buffered saline (PBS)
 - Les gants
 - Pipettes automatiques
 - Les Embouts
- ✓ **Coffrets d'extraction**
 - **QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen tissu et sang**
 - **Coffret de l'extracteur automatique**
 - **Réactifs utilisés pour l'amplification**
 - Amorces JW62/ JW63
 - Taq polymerase
 - MgCl₂
 - dNTP
 - **Réactifs utilisés pour l'électrophorèse d'ADN**
 - TAE×50 Tris-Acetic Acid-EDTA (Bio RAD)
 - Bleu de bromophénole
 - Bromure d'éthidium 10 mg/ml
 - Marqueur de taille
 - **Matériel utilisés pour l'examen microscopique des selles**
 - Verres à pieds
 - Lames
 - Lamelles
 - Microscope optique
 - Ligol
 - Pipettes
 - Formol +éther (pour la technique de concentration Ritchie).

- Coloration de Ziehl Nelson

II-b-Matériels biologiques :

• Matériel biologique analysé par la technique (ELFA)

393 sérums de patients parvenus au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'HCA, faisant partie de l'examen de routine. Le prélèvement est réalisé sur tube gélosé. Le sérum est récupéré après centrifugation à 2500 tr/min pendant 3 à 5 minutes. Enfin, les sérums sont conservés à + 4°C.

• Matériel biologique analysé par la technique Western-blot

Notre étude a porté sur l'analyse de :

- 11 couples de sérums mère-enfants, ces femmes ont connu une séroconversion durant leur grossesse.
- 4 couples de sérum/humeur aqueuse, provenant de patients présentant une uvéite.

• Matériels biologiques analysés par la technique PCR

a) Témoin positif

Le témoin positif pour la technique PCR est préparé à partir de tachyzoites récupérés du liquide d'ascite des souris BALBc infestées préalablement avec des tachyzoites.

b) Echantillons des prélèvements biologiques :

b-1-Chez l'homme

b-1-1- Placenta :

- 8 placentas ont été récupérés du service de gynécologie de l'HCA.

b-1-2-L'humeur aqueuse : quatre humeurs aqueuses ont été récupérées à partir de patients hospitalisés au service d'ophtalmologie de l'HCA.

b-1-3 - Le sang du cordon ombilical: Un prélèvement de sang a été récupéré de nouveau-né sur tube EDTA au niveau du service de gynécologie.

b-1-4- Sang périphérique : Deux prélèvements de sang ont été récupérés des patients atteints d'une toxoplasmose oculaire sur tubes EDTA au niveau du laboratoire de parasitologie.

b-2-Chez l'animal

b-2-1-Sang périphérique de brebis :

- 20 prélèvements sanguins effectués sur un élevage domestique (région de Blida)

b-2-2-Selles de chats et brebis :

- 50 échantillons de selles de chats domestiques et errants,

- 20 échantillons de selles de brebis, afin d'effectuer un examen coproparasitologique.

1) Méthodes

Dans cette étude, nous avons utilisé deux techniques sérologiques, la technique ELFA par l'automate VIDAS et le Western-blot ; et une technique moléculaire par PCR en utilisant l'amorce de *T.gondii* (JW62/JW63).

A - Recherche des anticorps anti-toxoplasmique par la technique Enzym Linked Fluorescence Assay (ELFA).

- **principe**

TOXO IgG est un test qualitatif automatisé sur un instrument VIDAS, permettant la mesure quantitative des IgG et les IgM anti-Toxoplasmiques dans le sérum ou le plasma humain (héparinate de lithium ou EDTA) par technique ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Le principe de dosage associe la méthode immuno-enzymatique sandwich en 2 étapes à une détection finale en fluorescence.

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument VIDAS.

(Voir figure N°09)

- **Etapes de la technique ELFA**

- **Etape 1** : après dilution, l'échantillon est aspiré puis refoulé dans le cône, ensuite, il y'a fixation des AC anti-IgG présents dans l'échantillon. Les composants non liés de l'échantillon sont éliminés par lavage.
- **Etape 2** : les IgG fixés par la phase solide vont se lier au conjugué. Le lavage élimine le conjugué non fixé.
- **Etape 3** : de révélation, le substrat (4-méthylombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône, l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-méthylombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm.
- **Etape 4** : les résultats sont calculés automatiquement par rapport à une courbe de calibration mémorisée et sont exprimés en UI.

- **Mode opératoire du test VIDAS Toxo IgG**

- Saisie des données MLE : à l'ouverture d'un nouveau lot, les spécifications doivent être saisies dans l'instrument VIDAS et la calibration doit être effectuée puis la refaire tous les 14 jours.

- Placer dans l'instrument les cônes TXG et les cartouches TXG. Vérifier la concordance des codes (couleurs et lettres) entre le cône et la cartouche.
- Ajouter 100 μ l du sérum à tester dans le 1^{er} puits de la cartouche (ainsi que le calibre S1 doit être utilisé en double, si le contrôle positif doit être testé, il sera identifié par C1, si le contrôle négatif doit être testé, il sera identifié par C2).
- Lecteur et impression des résultats après 40 min environ.

• Résultats

À la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée, puis imprimés.

Le seuil de positivité = 08 UI/ml.

• Interprétation

Les femmes qui présentent une sérologie : IgG + et IgM – sont considérées comme immunisées, et celles qui présentent une sérologie : IgG+ et IgM + sont considérées comme non immunisées.

Si le résultat demeure équivoque, il faut refaire le test avec un nouveau prélèvement.

Figure N° 09 : L'automate mini VIDAS (technique sérologique ELFA)



B -Recherche des anticorps anti *T.gondii* par le test Western-blot IgG-IgM

- **Principe**

Les antigènes de *Toxoplasma gondii* après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide ont été fixés par électro-transfert sur la surface de bandelettes de nitrocellulose. Les bandelettes sont fournies prêtes à l'emploi, numérotées et prédécoupées.

- **Mode opératoire**

- Chaque échantillon de sérum à tester est incubé séparément avec une bandelette. Les anticorps anti-*T.gondii* éventuellement présents se fixent sélectivement sur les antigènes présents sur les bandelettes. Le lavage élimine les anticorps non fixés.

- Chaque bandelette est ensuite incubée avec le conjugué anti-IgG humaines-Phosphatase Alcaline qui se lie aux anticorps anti-*T.gondii* éventuellement fixés. Le lavage élimine le conjugué non fixé.

- Lors de la dernière étape, cet immuno-complexe réagit sur le substrat : les bandes antigéniques reconnues par les anticorps anti-*T.gondii* de classe IgG éventuellement présents dans les échantillons sont révélées sous forme de bandes transversales violettes.

La réaction de coloration est arrêtée par un lavage à l'eau distillée. Les bandelettes sont séchées ; leur coloration est stable plusieurs années à l'abri de la lumière. (figure 10)

- **Résultats et interprétation**

- **Toxoplasmose congénitale**

La présence de bandes chez le nouveau-né qui sont absentes chez la mère se traduit par une synthèse propre chez le nouveau-né en faveur d'une infection fœtale.

- **Toxoplasmose oculaire**

La présence de bandes supplémentaires dans l'humeur aqueuse par rapport au sérum reflète une production locale des IgG en faveur d'une toxoplasmose oculaire.

Figure N° 10: Western Blot (WB)



C - Mise en évidence de l'ADN parasitaire de *Toxoplasma gondii* par PCR

1. Préparation des témoins

La préparation des témoins a été réalisée selon le mode opératoire ci-dessous

1-a- préparation du témoin positif : (Voir annexe 8)

1-b- préparation du Témoin négatif

Nous avons utilisé l'eau des ampoules de préparation injectable stérile, comme témoins négatifs de la réaction d'amplification et ce à défaut de filtres.

2- Extraction d'ADN de *Toxoplasma gondii*

L'ADN de *Toxoplasma gondii* a été extrait par trois méthodes en fonction de type de prélèvement :

- Kit Qiagen **QIAamp DNA Mini Kit** pour les tissus
- Kit Qiagen stools pour les prélèvements de selles
- l'automate SaMag 12 pour les prélèvements du sang

2-a- Extraction d'ADN de *Toxoplasma gondii* à partir des placentas par**(QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen)****• Principe :**

Il repose sur la filtration et l'adsorption de l'ADN sur une membrane en gel de silice. Les contaminants cellulaires sont éliminés par les différentes étapes de lavage. L'ADN est finalement dilué.

• Mode opératoire d'extraction pour tissu :

Cette étape consiste à prélever 2 mg de placenta au niveau des zones nécrosées puis les broyer manuellement, pour faciliter le passage du tissu à travers la membrane de nature Silico-silicate (**figure 11**). Le broyat est centrifugé dans 80µl de PBS. Rajouter ensuite 200µl du tampon ATL et 20µl de protéinase K, puis mettre au bain marie à une température de 56°C pendant 2 heures. Mélanger au vortex chaque demi-heure. Après 2 heures d'incubation, rajouter 200µl de tampon AL et 200µl d'éthanol à 100% homogénéiser au vortex pendant 15 à 20 secondes et transférer sur une colonne Qiagen, puis centrifuger 3min à 10 000 trs. 500µl de tampon de lavage AW1 puis 500µl AW2 sont rajoutés puis centrifuger 3min à 10 000trs. 300µl d'eau distillée stérile sont rajoutées. Laisser le tube en position verticale durant 3min puis centrifuger 3min à 10 000 trs. L'ependorf contenant l'ADN extrait est conservé à -20°C. (**Voir figure 12**)

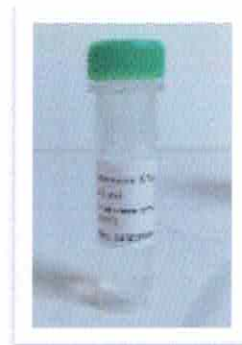
Figure 11: Mode opératoire de l'extraction d'ADN des tachyzoites de *Toxoplasma gondii* à partir des tissus.



Figure 12 : Mode opératoire d'extraction d'ADN des tachyzoites de *Toxoplasma gondii* à partir des Tissus QIAamp DNA Mini Kit



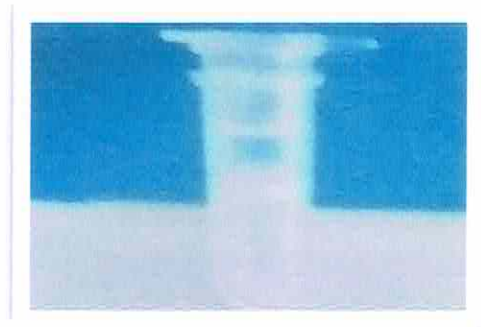
1/ prendre 2 mg de placenta



2/ ajouter 20 μ l de protéinase K et 200 μ l de tampon de lyse ATL après chaque étape mélanger au vortex 10 à 20 seconde.



3/ Le mélange est incubé au bain marie à 56°C pendant 30min. Vortexer chaque 5min



4/ 200 μ l de tampon AL ajouter 200 μ l d'éthanol 100%, puis "vortexer" et transférer sur une colonne Qiagen puis centrifuger.



5/ 500 μ l de tampon de lavage AW1 puis AW2 sont rajoutés puis centrifuger 3min à 10 000trs. Centrifuger 3min à 10 000trs à chaque étape.



6/ 300 μ l d'eau distillée stérile sont rajoutées. Laisser le tube en position verticale durant 3min puis centrifuger 3min à 10 000 trs. L'éppendorf contenant l'ADN extrait est conservé à -20°C.

2-b- Extraction d'ADN de *Toxoplasma gondii* à partir du sang par l'automate SaMag 12(sacace)

- **Principe**

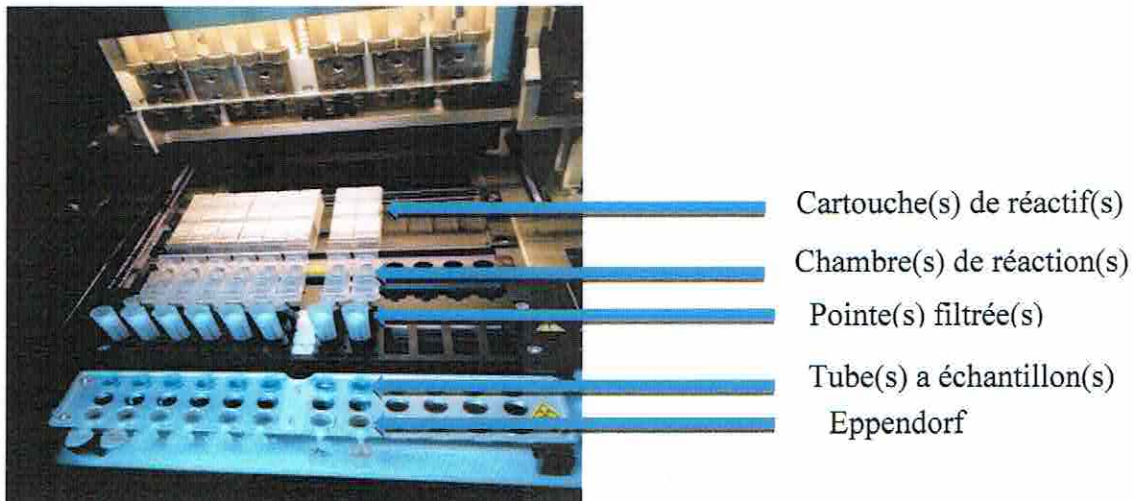
L'extraction d'ADN par l'automate SaMag 12 consiste :

- Une digestion enzymatique et solubilisation des lipides
- Une attraction magnétique (bille magnétique) de l'ADN.
- Une élution et remise en solution.

- **Mode opératoire**

Les différentes étapes d'extraction par l'automate SaMag 12 sont présentées dans la **Figure13**

**Figure N°13: Extracteur automatique (Sacace, Biotechnologies ; SaMag 12)
(Photo originale)**



- 2-c-Kit Qiagen stools pour l'extraction d'ADN de *Toxoplasma gondii* des selles (extraction d'ADN)
 - Mode opératoire : voir annexe n°9 et Figure 14

Figure n°14 : Différentes étapes d'extraction d'ADN dans les selles de chats par la méthode kit qiagen (stools) microscope optique x10, x40



A -Amplification d'ADN extrait

a- Principe

C'est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques et d'amorces à l'aide d'une polymérase thermostable.

a) Amorces utilisées

Selon la littérature, plusieurs gènes et paires d'amorces ont été utilisées pour mettre en évidence l'ADN parasitaire de *Toxoplasma gondii* par la technique PCR. Notre choix a porté sur l'amorce: JW62/JW63. **JW62:5'- TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC-3'**

JW63 :5'- GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG-3'

Cette séquence cible le gène B1 qui est le plus couramment amplifié. Il est répété 35 fois dans le génome du parasite. Ce gène est retrouvé dans toutes les souches de *T.gondii* (Burg, 1989).

b) Choix de protocole d'amplification :

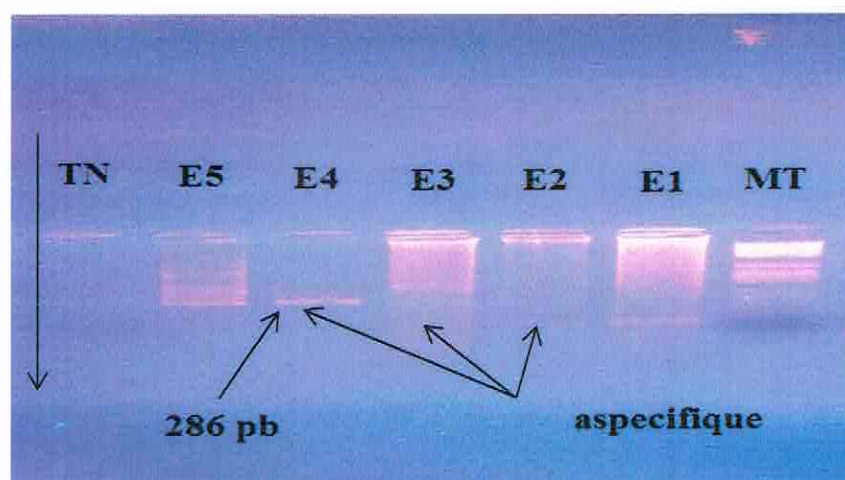
La réalisation d'une amplification d'ADN par PCR, nécessite un protocole final réalisable précis, rapide, reproductible et moins coûteux. Chaque laboratoire adapte un protocole en fonction des réactifs et les appareils disponible.

Afin d'optimiser les protocoles utilisant cet amorce, nous avons fait une recherche bibliographique afin de déterminer les concentrations adéquates de chaque composant de la réaction d'amplification ainsi que ces conditions à savoir, le nombre de cycle, les différentes températures. Notre choix a porté sur le protocole rapporté par **Pelloux et al (1998)**. (Voir **Tableau II et Figure 15**)

Tableau II : Protocole d'amplification d'ADN selon le protocole pelloux et al (1998)

composants	Volume	Etapes d'amplification	Condition
Tampon	5 μ l	Dénaturation	94°C pendant 4 min
Dntp	1 μ l	Dénaturation initiale	94°C pendant 30 s
MgCl ₂	1,75 μ l	Hybridation	55°C pendant 1 min
Amorce 1	1,25 μ l	Elongation	72°C pendant 1 min
Amorce 2	1,25 μ l	Elongation final	72°C pendant 5 min
H ₂ O	34,5 μ l	Nombre des cycles	35 cycles
Taq polymérase	0,25 μ l		
ADN	5 μ l		

Figure 15 : Résultats d'amplification d'ADN par l'amorce Jw62/Jw63 par le protocole Pelloux et al.



- Le protocole d'amplification d'ADN des tachyzoites par l'amorce Jw62/Jw63 (286pb) selon le protocole rapporté par Pelloux *et al* (1998) . Les résultats de l'amplification ont montré des bandes aspécifiques et une bande spécifique dont la taille est de 286 pb (**Figure 15**)

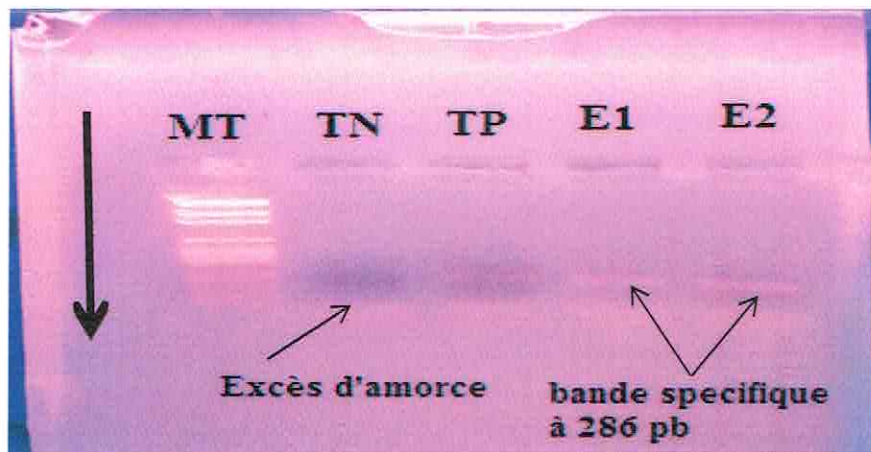
Pour éviter le problème des bandes aspécifiques, on a gardé les mêmes conditions d'amplifications toute en changeant le protocole en utilisant le **MasterMix** (voir **tableau III** et **figure 16**).

Tableau III : Protocole d'amplification avec l'amorce JW62/JW63 en utilisant le MasterMix

Constituants	Volume
MasterMix	25 μ l
Amorce 1	1,25 μ l
Amorce 2	1,25 μ l
H2O	17,5 μ l
ADN	5 μ l
Volume total	50 μ l

Etapes d'amplification	Conditions
Dénaturation initial	94°C pendant 4 min
Dénaturation	94°C pendant 30 s
Hybridation	55°C pendant 1 min
Elongation	72°C pendant 1 min
Elongation final	72°C pendant 5 min
Nombre de cycle	35 cycles

Figure n° 16: Résultat de l'amplification de l'ADN parasite extrait à partir des tachyzoites en utilisant l'amorce JW62/JW63 par protocole master Mix (photo originale).



MT : marqueur de taille.

TN : témoins négatif.

TP : témoins positif. ADN extrait à partir des tachyzoites

E 1, 2 : échantillon 1 échantillon 2

A -a-Préparation du MIX

Dans un tube de 1,5ml, mélanger les réactifs par ordre. Commencer par l'eau, puis le tampon, le $MgCl_2$, ensuite les amorces et en dernier la Taq polymérase. Répartir le volume total du mix dans des tubes eppendorfs de 0.5ml, puis rajouter le volume d'ADN extrait dans chacun des eppendorfs sauf pour le témoin négatif. Introduire les Eppendorfs contenant les constituants d'amplification dans le thermocycleur (voir figure 17,18,19).

Figure N°17 : Hôte de préparation du mix



Figure 18: Différentes étapes de préparation du mix



Figure 19 : Amplification d'ADN de *Toxoplasma gondii* (dénaturation, hybridation, élangation)



A –b-La révélation par électrophorèse sur gel d'agarose

- **Principe :**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique utilisée en biologie moléculaire pour la séparation des acides nucléiques sous l'effet d'un champ électrique.

- **Mode opératoire**

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TAE. 20µl de bromure d'éthidium (BET) ont été rajoutés à la solution d'agarose afin de visualiser les brins d'ADN. La migration électrophorétique est réalisée à 90V pendant 45 min. La révélation des résultats de la PCR se fait sur un Transilluminateur à UV. Enfin, une coloration au bleu de bromophenol est réalisée.

B- La révélation :

La technique la plus simple est de faire un gel d'électrophorèse et révéler au bromure d'éthidium. Cette méthode permet de contrôler la spécificité de l'amplification et de vérifier que le produit de l'amplification correspond bien à la taille attendue.

1 - Principe de l'électrophorèse :

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode utilisée en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur taille. Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose, les molécules de

petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

a-Gel d'agarose :

C'est le support de migration composé essentiellement de l'agarose qui est un polymère à base d'agar purifié, dont la concentration dépend de la taille du fragment à amplifier, un gel de 1% est utilisé et plus on augmente la concentration d'agarose, plus le gel devient discriminant. (Voir Tableau IV)

Tableau IV: Pouvoir de séparation d'ADN selon la concentration d'agarose du gel (Michael, 1998).

Concentration d'agarose (% en M/V)	Gamme de tailles idéales
0.3	5 kb – 60kb
0.6	1 kb – 20kb
0.7	800 pb – 10kb
0.9	500 pb – 7 kb
1.2	400pb – 6 kb
1.5	200 pb – 3kb
2.0	100 pb – 1, 2 kb

Selon le tableau ci-dessus, la concentration du gel pour l'amorce JW62/JW63 est environ 1.5%,

b-Tampons:

Les tampons les plus souvent utilisés sont le Tris/Acétate/EDTA (TAE) et le Tris/Borate/EDTA (TBE)

En réalité, le choix du tampon est fonction de la taille du fragment à révéler. Le TAE constitue le meilleur tampon pour révéler le fragment qui dépasse les 300pb car il possède le plus faible pouvoir tampon mais produit une meilleure séparation pour les fragments d'ADN de grande taille, généralement supérieure à 300 pb. A l'inverse, le tampon TBE connu pour fournir une meilleure résolution que le TAE pour les fragments inférieurs à 300 pb.

Cependant, dans notre travail, nous avons utilisé le TBE car il nous a donné des résultats satisfaisants, il présente aussi l'avantage d'être réutilisable plusieurs fois.

c-Bromure d'éthidium :

C'est un composé organique aromatique possédant un ammonium quaternaire, c'est un produit dangereux qui doit être manipulé avec précautions. Les résidus doivent être éliminés, c'est un déchet dangereux. Le bromure d'éthidium ayant la faculté de se lier à l'ADN, possède un effet mutagène important et pourrait être également cancérigène et tératogène par ses effets d'intercalation. Il est couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

-La concentration finale du bromure d'éthidium avoisine les 0,5mg/ml. Sachant que la concentration de la solution mère est de 20mg/ml, pour 100ml de la solution d'agarose on rajoute 2,5µl du BET (**Michael, 1998**).

2 - Protocole opératoire**a-Préparation du gel d'agarose.**

- Dans une fiole Erlenmeyer, peser la quantité d'agarose déterminée (**Tableau N°IV**) et la faire dissoudre complètement dans le tampon en plaçant l'erenmeyer au four à micro-ondes (2 à 3 minutes) et en agitant de temps à autre.
- L'agarose est totalement dissoute lorsque les grains initialement visibles ont complètement disparu. Laisser refroidir en agitant constamment.

NB : il ne faut jamais incorporer le BET dans l'agarose avant la dissolution complète (vapeurs toxiques).

- Avant de couler le gel d'agarose, vérifier la position des peignes. Il faut qu'ils soient au minimum à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.
On coule lentement le gel dans le moule sur 2 à 3 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne et on laisse refroidir à température ambiante.
- On laisse aux moins 2 heures, jusqu'à ce que le gel devienne froid et d'apparence opalisant.

On retire soigneusement les peignes et on découpe le gel selon le nombre de puits qui est fonction du nombre d'échantillons. Le reste du gel non utilisé, peut

être conservé à +4°C plusieurs jours en prenant le soin de l'emballer dans un film plastique rapidement, avant qu'il ne perde trop d'eau par évaporation.

On place le gel dans la cuve et on s'assure qu'il est bien recouvert de tampon, (environ 2 à 5mm au dessus de la surface du gel).

b-Préparation et dépôts des produits d'amplification (les amplicons)

- Dans les puits d'une plaque de microtitration, on dépose un colorant le (bleu de bromophénol) préalablement préparé à raison de 6µl par cupule sauf pour la dernière cupule ou on met 3µl. Cette cupule sera réservée au marqueur de taille. Le colorant migre plus rapidement que les amplicons, (témoin de la migration), il densifie l'échantillon pour une meilleure visualisation et permet le dépôt de l'ADN au fond des puits, donc alourdit l'ADN pour qu'il ne flotte pas sur le tampon.

- On rajoute un volume de 20µl des produits PCR tout en commençant par le témoin négatif puis les échantillons et les témoins positifs. Enfin, on rajoute un volume de 1µl de marqueur de taille moléculaire dans la cupule qui contient 3µl de bleu de bromophénol additionné à 9µl d'eau distillée.

- On dépose les échantillons dans le gel du côté de la cathode, la migration se faisant vers l'anode, et en respectant l'ordre prévu.

c-Migration

- On ferme le couvercle de la cuve et on la branche au générateur réglé à une tension de 70V.

En utilisant un voltage plus élevé, la séparation des bandes sera moins nette. Plus la tension est élevée plus la migration est rapide mais moins précise.

-La durée de la migration est proportionnelle à l'épaisseur du gel et à la quantité de tampon dans la cuve. La durée moyenne de migration est d'environ 45 minutes. On arrête la migration quand le bleu de bromophénol (bleu foncé) arrive à environ 2cm de l'extrémité du gel (bord du côté opposé aux puits témoin de la fin de la migration).

d-Lecture

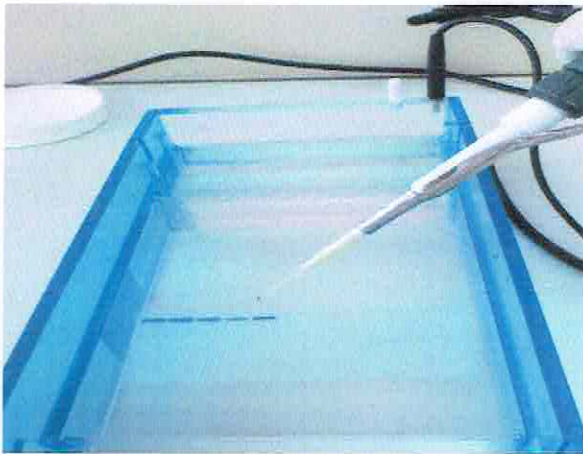
-On transfère le gel sur la table UV, cette manipulation doit être faite avec soin car le gel est très fragile et peut glisser très facilement de son support.

-Une exposition du gel d'agarose à l'UV permet une bonne visualisation des bandes de migration grâce à l'absorption des UV par le bromure d'éthidium intégré entre les bases

nucléotides. La validation de la technique se fait par rapport au témoin positif, témoin négatif et le marqueur de taille. (Voir Figure 20)

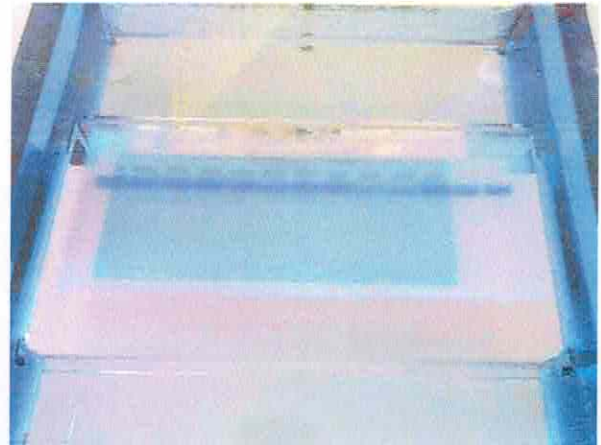
Figure 20 : Etapes de l'électrophorèse de révélation d'ADN

1



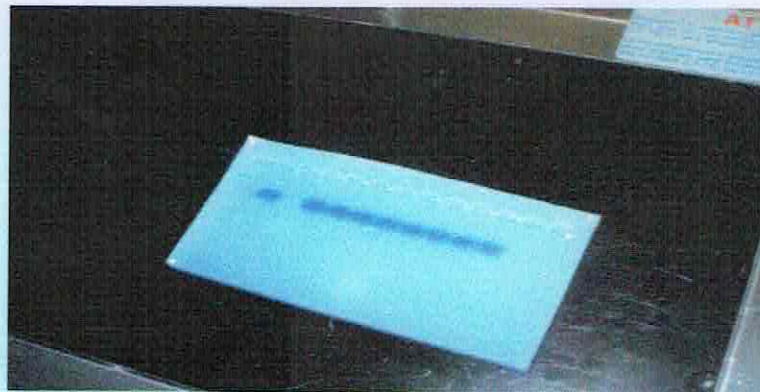
Dépôt des échantillons dans le gel.
Respecter l'ordre prévu, et charger minutieusement les puits

2



Gel d'agarose au cours de l'électrophorèse

3



Gel d'agarose après électrophorèse sur table UV

Noter la position du bleu de bromophénol à environ 2 cm témoin de la fin de la migration

3-Examen parasitaire direct des selles :

Cet examen a concerné les 50 selles de chats et les 20 selles provenant des brebis à la Recherche des oocystes de *Toxoplasma gondii* qui consiste à faire.

3-1-Examen macroscopique : cet examen a été effectué afin noter la couleur et la consistance ainsi que l'aspect général de la des selles

3-2-Examen direct microscopique :

- **Lecture a l'état frais des selles et coloration instantané au ligol ou violet de gentiane.**
- **Utilisation de la technique de concentration Ritchie :**
- ✓ **Protocole :** mettre une noix de selles dans des tubes de 10 ml et rajouté 1/3 d'ether et 2/3 de formol. Ensuite, mettre à la centrifugation 1500 tours pendant 3 mn, récupéré le culot et mettre sur une lame une goutte du culot d'un coté et une autre de l'autre coté de la lame en ajoutant une goutte de ligol (méthode de concentration de kystes).
- **coloration de frottis de selle de brebis par la technique de ziehl neelson (mise en évidence de cryptosporidium**
- ✓ **Protocole:** effectuation d'un frottis sur lame après séchage , on procède a la coloration suivante.
 - fixation avec le méthanol 5 mn
 - coloration a la fushine phéniqué 1 heure
 - différenciation a l'acide sulfurique 10 % pendant 20 secondes.
 - contre coloration au vert malakite 5 mn. (Voir Figure 21)

Figure 21 : Différentes étapes d'examen microscopique des selles



CHAPITRE III
RESULTAT ET DISCUSSION

III- Résultats de l'étude sérologique

III.1-Résultats sérologiques obtenus par l'automate VIDAS

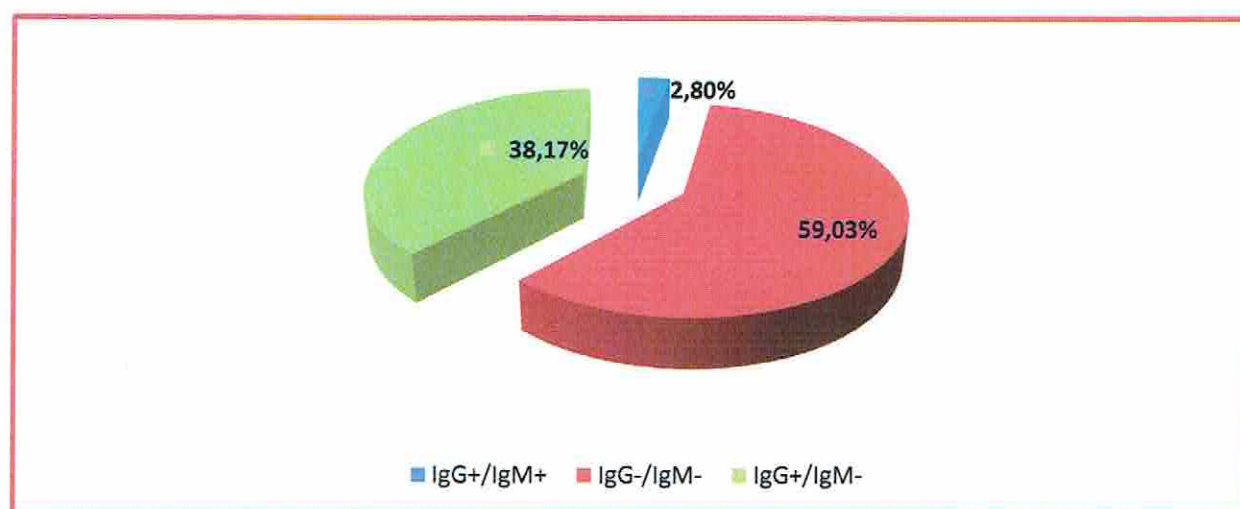
L'analyse des 393 sérums prélevés chez les femmes enceintes au niveau de l'HCA a montré que 40,97% des cas soit (161/393) présentent un profil sérologique en faveur d'une toxoplasmose ancienne avec des IgG positive et absence d'IgM. Sur les 161 patients (2,8% des cas soit (11/161)) présentant une séroconversion avec des IgG et IgM positive, et 59,03% des patients sont négative (IgG-,IgM-) (Tableau V, Figure 22).

Le suivi sérologique par la technique ELFA a révélé une séroconversion de 11 femmes enceintes durant les deux premiers trimestres ; l'application du Western-blot dans le suivi du nouveau-né apparaît nécessaire. Ce test permet de mettre en évidence les anticorps néo-synthétisés par le fœtus.

Tableau V : Profil sérologique des femmes enceintes .

	1 ^{er} contrôle	2 ^{ème} contrôle	3 ^{ème} contrôle	VIDAS	Nombre de cas	%
1cas	IgG-/IgM-	IgG+/IgM+	IgG+/IgM+	séroconversion	11	2,80%
2cas	IgG+/IgM-	IgG+/IgM-	IgG+/IgM-	Immunité ancienne	150	38,17%
3cas	IgG-/IgM-	IgG-/IgM-	IgG-/IgM-	patiente non immunisée	232	59,03%

Figure N° 22 : Répartition du profil sérologique des femmes enceintes obtenus par l'automate VIDAS



III-2-Résultats sérologiques obtenus par Western-blot :

- **Résultats de toxoplasmose congénitale**

Les sérums des 11 femmes qui ont montré une séroconversion et les sérums de leurs enfants ont été analysés par le Western-blot.

L'analyse sérologique des 11 couples de sérum mère-enfant a révélé que la sérologie de 10 nouveau-né (90,91%) présentent le même profil que leur maman. Ce résultat indique l'absence d'infection fœtale. Cependant, 01 seul couple s'est révélé positif où le profil du nouveau- né est différent de celui de sa mère. (**Tableau VI ; figure 23 et 24**).

Tableau VI : Profil sérologique des 11 couples de sérum mère-enfant obtenu par Western-blot :

période	Western-blot				Résultats Interprétation
	IgG		IgM		
	Mère	NNé	Mère	NNé	
J0	+	+	+	-	90,91%, Même profil que la maman donc pas d'infection
J10	+	+	+	-	
J90	+	+	+	-	
J0	+	+	+	+	9,09%, toxoplasmose congénitale
J10	+	+	+	+	
J90	+	+	+	+	

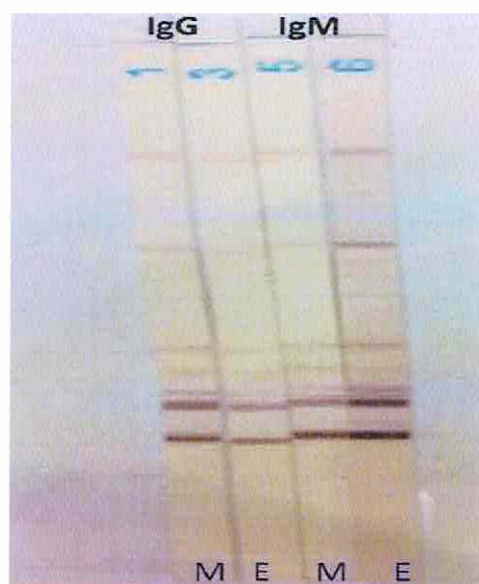


Figure 23: Profil des IgG-IgM positif chez la mère (M) et même profil chez l'enfant (E) à J90 donc pas d'infection fœtale (photo originale).

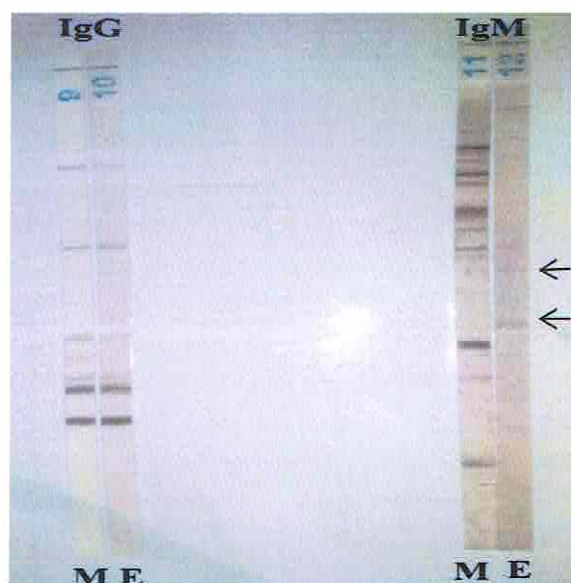


Figure 24: Profil des IgG de l'enfant (E) identique de celui de sa mère (M), et présence des IgM néo-synthétisés chez l'enfant (photo originale).

• Résultats de la toxoplasmose oculaire

Notre étude a porté sur 4 couples sérum/humeur aqueuse, dont les patients ont présenté une uvéite. Les résultats sérologiques révélés par Western-blot sont présentés dans le (Tableau VII)

Tableau VII: Profil des couples (sérum/humeur aqueuse) obtenu par Western-blot

	Western-blot				Interprétation
	IgG		IgM		
	HA	Sérum	HA	Sérum	
Patient 1	+	+	-	+	Positif : présence d'une bande supplémentaire dans HA
Patient 2	+	+	-	+	Positif : présence de 3 bandes supplémentaires dans HA
Patient 3	+	+	-	+	Positif : plus de 4+ bandes supplémentaires dans HA
Patient 4	-	-	-	+	Négatif : pas d'infection

L'étude comparative entre le profil des IgG et IgM anti-toxoplasmiques des 04 couples sérum / humeur aqueuse, prélevés chez les patients atteints d'uvéïte, par le Western-blot montre trois couples sérum / humeur aqueuse positif, avec 75% des cas qui présentent 04 bandes supplémentaires dans l'humeur aqueuse par rapport au sérum. 01 cas négatif qui révèle l'absence des IgG et IgM dans l'humeur aqueuse (Figure 25 et 26).

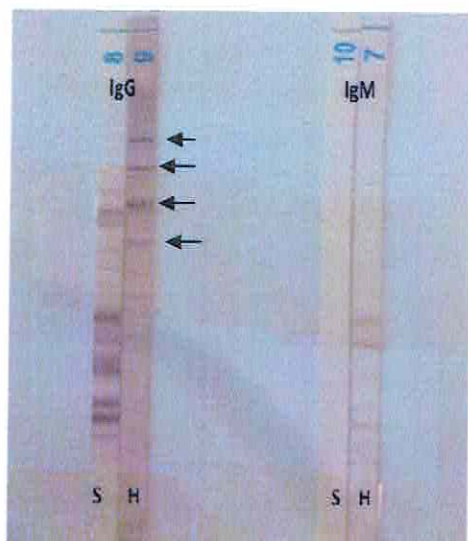


Figure 25 : Analyse des profils positifs IgG-IgM anti *Toxoplasma gondii* Serum(s) et humeur aqueuse(H). (photo originale)

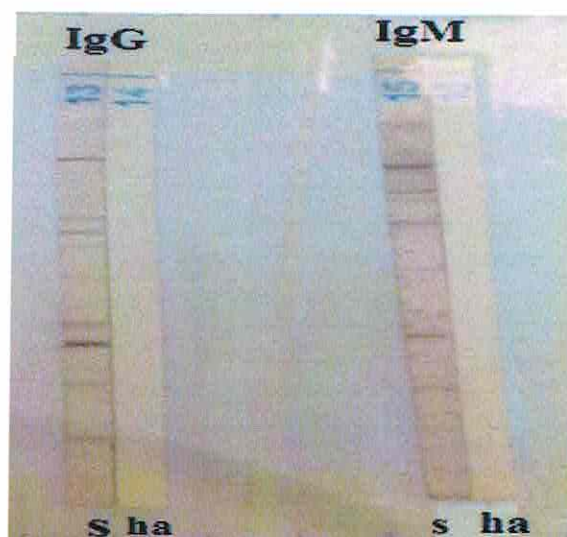


Figure 26 : Analyse des profils négatifs IgG-IgM anti *Toxoplasma gondii* sérum (s) et l'humeur aqueuse (ha) (photo originale).

II-3- Résultats du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose par la technique Polymérase Chain Réaction (PCR)

III-3-1- Résultats de la PCR à partir des placentas :

Notre étude a porté sur l'analyse par PCR de 08 placentas reçus au laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'HCA (figure 27)(Tableau VIII). L'amplification de l'ADN de *T.gondii* extrait à partir des placentas en utilisant l'amorce JW62/JW63 a montré que 04 placentas sur 08 sont positifs. Ils sont caractérisés par des bandes de 286 pb.

Figure n°27 : Résultats de la PCR à partir des placentas

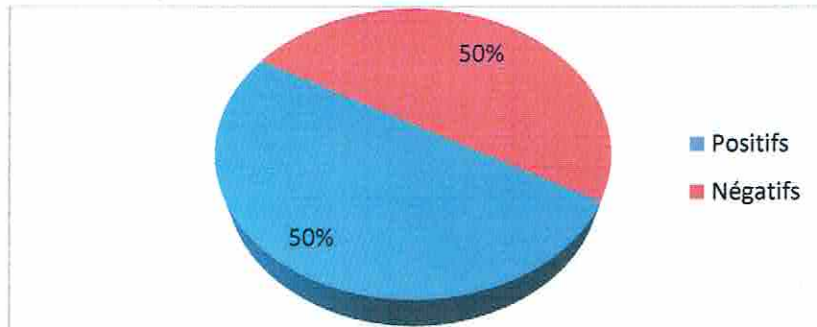
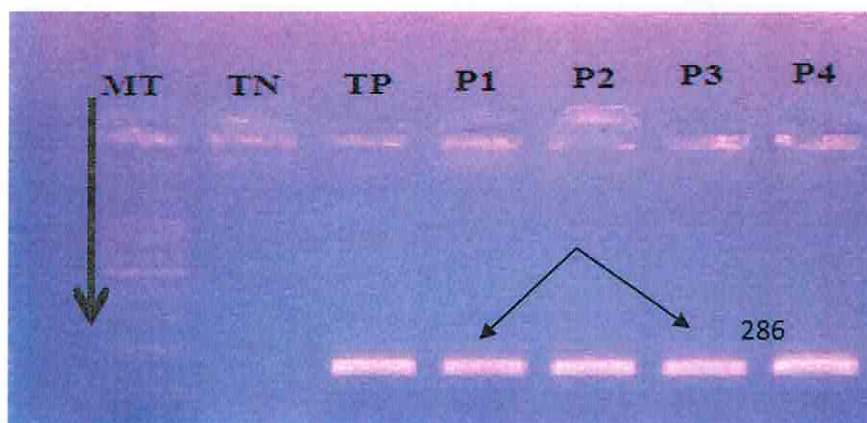


Tableau VIII : Résultat de la PCR à partir d'ADN extrait du placenta.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8
JW62/JW63	+	+	+	+	-	-	-	-

L'analyse moléculaire a montré que 04 placentas sur 08 étudiés sont positifs avec 02 cas correspondant à des patientes qui ont subi un avortement thérapeutique à 35SA et 5J et 40SA et 2J et les deux autres n'ont pas connus un suivi sérologique durant leur grossesse. (Figure 28).

Figure 28 : Résultats de l'amplification d'ADN parasite extrait des placentas, par l'amorce JW62/JW63. (Photo originale).



MT : marqueur de taille

TN : témoin négatif

TP : témoins positif extrait à partir des tachyzoite

P1, P2, P3, P4 : ADN de T.gondii extrait à partir des placentas

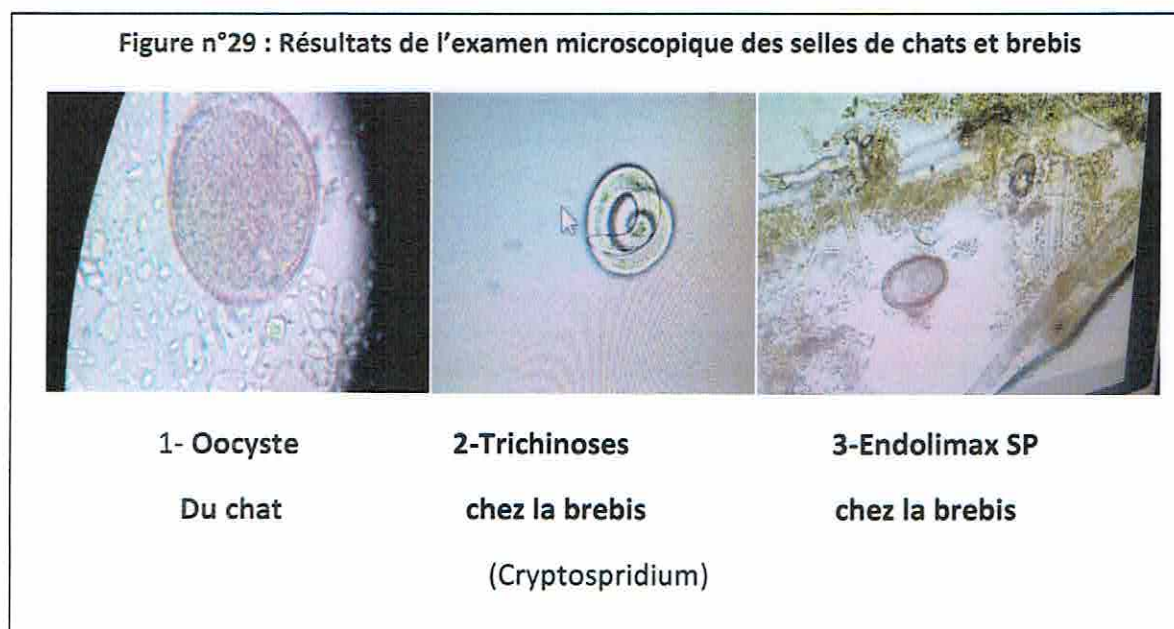
III-3-2- Résultats de la PCR réalisée avec l'ADN extrait de *T.gondii* à partir des liquides biologiques :

L'analyse des 04 échantillons d'humeur aqueuse par une PCR classique a révélé 04 résultats négatifs, ainsi que pour les échantillons de cordon ombilical et le sang périphérique provenant des patients présentant une toxoplasmose oculaire

III-4- Résultats d'examen parasitaire des selles de chats et brebis :

1- L'examen direct de 50 selles de chats au microscope optique au grossissement x10, x40 : a mis en évidence la présence d'oocystes de *Toxoplasma gondii* dans 15 échantillons (selles des chats errants).

2- L'examen microscopique des selles de brebis, a mis en évidence des parasites divers : Amibes, Giardia intestinales, Endolimax nanus, des levures de Géotrichom, les trichinoses (voir figure 29)



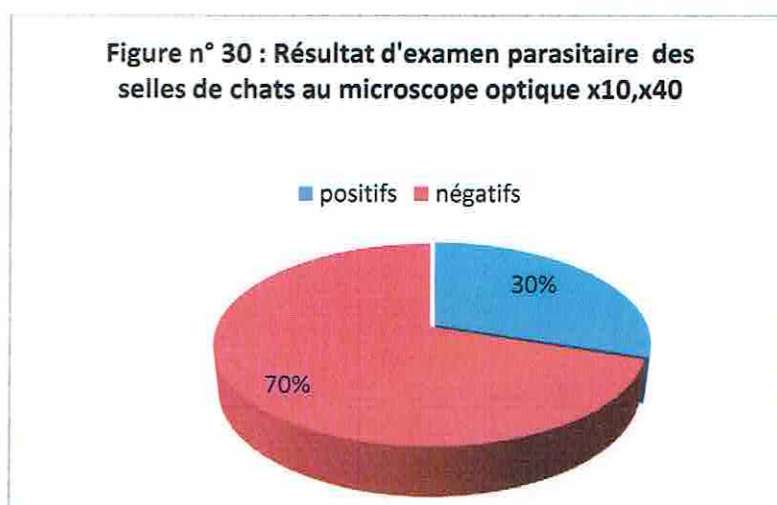
III-5- Résultats de la PCR réalisée avec l'ADN extrait de *T.gondii* à partir des liquides biologiques (chats et brebis)

III-5-1- Résultats de la PCR réalisée avec l'ADN de *Toxoplasma gondii* extrait des selles de chats.

L'analyse de 12 échantillons de selle de chats qui présentent des oocystes de *Toxoplasma gondii* , par une PCR classique a révélé des résultats positifs en utilisant l'amorce JW62/JW63 et le protocole Master Mix .(voir figure N°30 et tableau IX)

Tableau IX : Résultat de la PCR et de l'examen parasitaire direct au microscope optique x10, x40 des selles de chats.

Nombre de selles de chats examinés	Nombre de selles de chats domestiques	Nombre de selles de chats errants	Nombres de chats présentant des oocystes (examen microscopique direct)	Nombre de selles de chats examinés par la PCR	Résultats de la PCR
50	25	25	15	12	12
100%	50%	50%	30%	24%	24 %

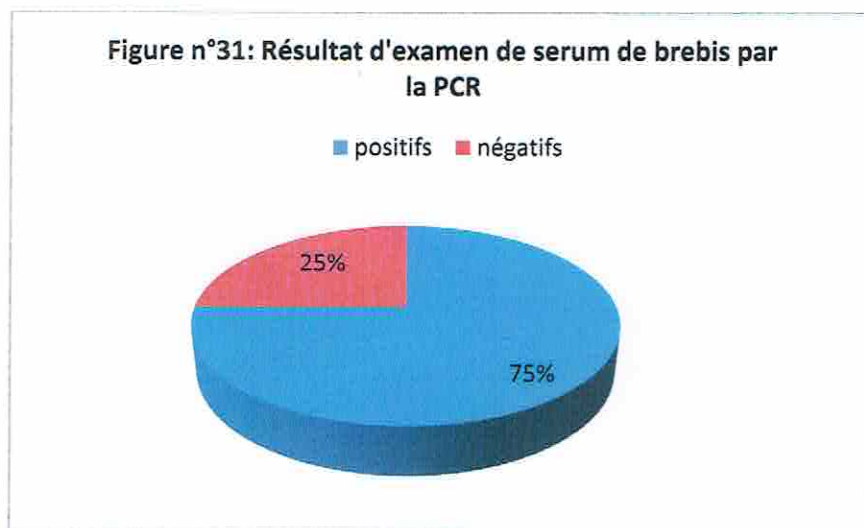


III-5-2-Résultats de la PCR réalisée avec l'ADN de tachyzoïtes extrait du sang périphérique des brebis.

L'analyse de 09 échantillons de sang périphérique de brebis, par une PCR classique révèle des résultats positifs et cela après extraction et amplification de l'ADN des Tachyzoïtes par l'amorce JW62/JW63, (voir figure n° 31 et tableau X)

Tableau X: Résultat de la PCR à partir des sérums de brebis

Nombre de selles de brebis examinés au microscope x10, x40	Nombre de sérums de brebis examinés par PCR	Nombre de sérums positifs (PCR)	Nombre de sérums négatifs (PCR)
20	12	09	03
%	100%	70%	30%

Figure n°31: Résultat d'examen de serum de brebis par la PCR

Discussion

Toxoplasma gondii est un parasite responsable de la toxoplasmose, cette dernière est souvent asymptomatique mais a des conséquences graves chez la femme enceinte et l'immunodéprimé. Elle est cosmopolite, sa fréquence dépend de l'alimentation et du mode de vie. (Wallon *et al* .1994)

L'enjeu est considérable car la toxoplasmose congénitale constitue, actuellement, l'une des principales affections susceptibles de compromettre le déroulement d'une grossesse en mettant en jeu le pronostic vital du fœtus ou à échéance plus lointaine le pronostic fonctionnel de l'enfant.

L'analyse de 393 sérums prélevés chez les femmes enceintes au niveau du laboratoire de Parasitologie et Mycologie de l'HCA montrent que 40,96% des cas soit (161/393) présentent un profil sérologique en faveur d'une toxoplasmose ancienne avec des IgG positif et absence d'IgM, Ces résultats s'alignent avec ceux rapportés par (Montoya *et al* 1999).

La séroprévalence de la toxoplasmose a été étudiée par plusieurs auteurs. Il a été rapporté chez la femme enceinte une séroprévalence de 33,33% à Marrakech (Maroc) (Biava et Jana, 1983), 57% en Tunisie (Khemiri et Mahjoub, 1993) 52,8% dans le nord de la Tunisie, 51,80% en Iran (Assma, 1994). 54% en France 1995 et 44% (Berger *et al* ,2003). L'étude réalisée par (Makuwa *et al* ,1992) au Congo montre 40% des cas négatifs et 60% positifs.

Une enquête menée en Algérie au laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'HCA, a révélé une séroprévalence de 50,7% (Abidat *et al* 2009).

L'estimation de la séroprévalence envers *Toxoplasma gondii* chez l'humain est très hétérogène et varie énormément d'un pays à l'autre, mais aussi d'une région à l'autre dans le même pays et entre différents groupes ethniques vivants dans une même région (AFSSA, 2005).

Sur les 161 patients ,2% des cas soit (8 /161) présentant une séroconversion avec des IgG et IgM positifs, La prévalence des séroconversions de la toxoplasmose congénitale a travers le monde est estimée entre 0.68 en Angleterre à 40 cas pour 1000 femmes séronégatives aux Emirats arabes (Tenter, 2000).

En Algérie, au Centre, l'incidence de la toxoplasmose chez la femme enceinte était de 0.98% d'après Schneider en 1977 et est passée à 3.5% dans L'étude de Bouchène (1981) avec 2.5‰ cas de toxoplasmose congénitale, alors qu'à l'Est, elle est de 1.1 % (Messerer 2014).

En France, d'après le rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire, l'incidence de la toxoplasmose chez la femme enceinte séronégative en 2003 a été estimée entre 6 à 7 cas pour 1000 grossesses et Garcia-Méric en 2010 rapporte un nombre d'environ 300 à 400 cas de toxoplasmose congénitale par an. (Berger, 2007).

Dans ce travail la prévalence des femmes non immunisées est de 59,03% des cas avec des (IgG-, IgM-) négatives. Ces taux d'infestation par *Toxoplasma gondii* semblent être liés aux habitudes

culturelles et culinaires, la consommation de viande saignante, l'ingestion de fruits et de légumes non lavés contaminés par des oocystes et la présence d'un chat au foyer. Il semblerait cependant que le rôle direct du chat soit moins déterminant que les autres facteurs (**Goulet et al, 1990**).

Les sérums des 11 femmes qui ont montré une séroconversion et les sérums de leurs enfants ont été analysés par le Western-blot.

L'analyse sérologique des 11 couples de sérum mère-enfant a révélé l'absence d'infection fœtale dans 90,91%. Cependant, 01 seul couple (9,09%) s'est révélé positif après un contrôle.

Une prévalence de 18,3% de la toxoplasmose congénitale sur l'analyse de 126 couples de sérums (nouveau nés-mère), soit 23 nouveaux nés infectés pendant la gestation (**Tissot-Dupont , 2003**).

La comparaison simultanée des profils de reconnaissance antigénique des anticorps de 2 compartiments différents: sang maternel/ sang du nouveau-né, démontre la présence de bandes supplémentaires chez le nouveau-né, prouvant ainsi que le fœtus, via ses anticorps, reconnaît des antigènes parasitaires différents de ceux de la mère, et affirme ainsi le diagnostic de toxoplasmose congénitale (**Remington, 1985**).

La toxoplasmose congénitale est la conséquence d'une primo-infection toxoplasmique chez une femme en cours de grossesse. Après contamination de la mère, le parasite passe dans la circulation sanguine. Cette parasitémie maternelle est précoce et transitoire (de l'ordre de 10 à 15 jours) et antérieure à l'apparition des anticorps .Ce caractère précoce et transitoire explique la rareté des toxoplasmoses congénitales consécutives à une infection de la mère contractée avant la grossesse (**Garin , 1984**).

Dans le cas d'une infection maternelle proche de la conception, la transmission de parasite au fœtus est faible : moins de 2%. Lorsque l'infection maternelle est proche du terme de la grossesse, la transmission du toxoplasme au fœtus est de l'ordre de 90%. A ce stade, la contamination fœtale est en général contemporaine de la contamination maternelle. En effet, le système immunitaire du fœtus est en place et sera secondairement renforcé par l'immunité passive de la mère (**Desmonts et al ,1982**).

L'application du Western-blot dans le suivi des nouveau-nés jusqu'à l'âge de 3 mois apparaît nécessaire, en particulier dans les séroconversions des deux premiers trimestres. Pour cela il faut insister sur l'intérêt de renouveler le Western-Blot tous les mois en cas de séroconversion précoce des mères, en raison du manque de maturation du système immunitaire fœtal avant la 20^{ème} semaine, ou au contraire en cas de séroconversion très tardive, le délai n'ayant pas été suffisant entre l'infection et la naissance pour observer la synthèse d'AC (**Robert-Gangneux ,1999**).

Il est clairement démontré que l'intérêt du diagnostic sérologique en fin de grossesse réside

dans le diagnostic des cas asymptomatiques de toxoplasmose congénitale faisant suite à des séroconversions de fin de grossesse où le risque de contamination fœtale est élevé, estimé à 90 % pour les infections des 2-3 dernières semaines de gestation. La majorité des nouveau-nés atteints sont asymptomatiques à la naissance d'où la nécessité d'un dépistage systématique à la naissance s'ils ne sont pas diagnostiqués et traités, ils vont développer des séquelles durant l'enfance et à l'âge adulte.

Les conséquences d'une toxoplasmose congénitale chez les nouveaux nés est l'apparition d'une toxoplasmose oculaire, qui se traduit par une uvéite ou une cicatrice chorioretinienne. (**Desmonts et al, 1982**).

L'étude comparative entre le profil des IgG et IgM anti-toxoplasmiques de 04 couples sérum / humeur aqueuse, prélevés chez les patients atteints d'uvéite par le Western-blot montre Trois couples sérum / humeur aqueuse positifs soit (75%) et un seul couple négatif soit (25%).

La sensibilité de Westen-blot dans notre étude est de l'ordre de 75%. Cette valeur s'approche de celle trouvée par **Thelliez (1993)** qui révèle la présence d'IgG locales dans 56% des cas. **Bastien (2002)** révèle des pourcentages oscillant entre 15 et 53%.

Desmonts 1973 préconise de refaire l'analyse avec un nouveau prélèvement oculaire en cas de résultat négatif.

Pour certains auteurs, la date de réalisation de la ponction oculaire semble être un facteur essentiel pouvant modifier les résultats. En effet, au début de l'affection la synthèse locale d'anticorps n'a pas encore débuté, le maximum de production des anticorps se situe vers la 4^{ème} semaine à partir du début des signes cliniques (**Payeur et al, 1988**).

Une ponction réalisée 3 semaines après le début des symptômes permet de trouver une production locale d'anticorps dans 57% des cas (**Garweg et al, 2000**).

Dans un deuxième volet de notre étude, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une PCR classique afin d'évaluer la détection précoce d'une infection fœtale à la naissance, et aussi l'atteinte d'une toxoplasmose oculaire.

Le diagnostic moléculaire des maladies parasitaires consiste à mettre en évidence l'ADN du parasite dans divers prélèvements. Parmi les maladies parasitaires, le diagnostic de la toxoplasmose bénéficie largement de l'apport des outils moléculaires.

Dans cette présente deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressées à l'extraction de l'ADN parasitaire de *Toxoplasma gondii* à partir des placentas, des humeurs aqueuses et du sang périphérique et aussi du sang du cordon ombilicale et les selles de chat par deux méthodes(le kit Qiagen et l'extracteur SaMag-12). Les résultats de l'extraction d'ADN par les deux méthodes n'ont montré aucune différence significative relative à la pureté d'ADN.

Pour l'extraction de l'ADN parasite à partir des placentas, la méthode Kit Qiagen a été combinée avec une étape de lyse des tissus.

La deuxième étape est de réaliser une amplification d'ADN de *Toxoplasma gondii* par le couple d'amorce :

- JW62/JW63 de 286 pb (amorce présent dans le gène B1).

Il est clairement démontré que plusieurs facteurs influence la spécificité et l'efficacité de la PCR, la concentration de la Taq polymérase, la concentration des amorces et la température d'hybridation (**Kim et Smithies, 1998**).

Après une mise au point des protocoles fiable qui nous permet d'obtenir des résultats spécifiques, nous avons réalisé une PCR classique sur différents échantillons biologique dans l'objectif était d'améliorer le diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

L'analyse des 8 placentas récupérés du service de gynécologie de l'HCA pour un diagnostic néonatal par la technique PCR a révélé que ; les 02 cas qui ont connue un suivi sérologique prénatal par les deux teste sérologiques (test d'avidité VIDAS et l'immunoblot WB), ont présenté une séroconversion maternelle mais pas d'infection fœtale. Le diagnostic moléculaire par PCR a aussi révélé l'absence d'ADN de *Toxoplasma gondii* dans le placenta et le sang du cordon, donc pas d'infection toxoplasmique.

Pour la patiente qui a connu un suivi prénatal et qui présente une séroconversion et pas de suivi néonatal par le WB, le résultat de PCR était négatif ; De même, pour la patiente qui n'a connu aucun suivi sérologique prénatal durant la grossesse, le diagnostic néonatal par PCR était négatif.

Et parmi ces placentas, 02 cas qui n'ont pas été suivis durant la grossesse mais qui ont révélé par PCR la présence d'ADN toxoplasmique dans le placenta.

En dernier ,02 cas dont on ne connaît pas leur statut immunitaire durant la grossesse ou après la naissance, leur diagnostic néonatale par PCR sur les placentas a révélé la présence d'ADN toxoplasmique ; ces deux cas ont subi un avortement thérapeutique ou mort fœtale à 30 SA et 5J et à 45 SA et 2J selon leur suivi gynécologique, pour cela on peut donc liée la mort fœtale à une infection toxoplasmique.

La PCR effectuée sur les placentas a montré un haut niveau de spécificité pour le diagnostic. Cependant, les résultats négatifs ne peuvent pas exclure une infection fœtale. Le dépistage néonatal et postnatal identifie ces cas (**Pelloux et al ,1998**).

Dans notre étude, la recherche directe du parasite par PCR a été réalisée également sur 4 prélèvements d'humeur aqueuse. Dans les 3 cas étudiés, la PCR est négative malgré la présence des anticorps spécifiques dans l'humeur aqueuse qui est démontré par la technique de WB.

Selon certains auteurs, la présence d'anticorps serait responsable de la neutralisation des toxoplasmes (**Brezin et al, 1991**) (**Cazenave et al, 1994**); (**Garweg et al, 2000**). De plus, la distance entre la chambre antérieure et le site initial rétinien de la lésion pourrait constituer une autre explication au pourcentage élevé de résultats négatifs (**Brezin et al, 1991**).

La mise au point de la PCR et son application au diagnostic de la toxoplasmose oculaire en 1996 (**Aouizerate et al, 1991**) a permis d'affiner le diagnostic notamment dans les situations difficiles. Plusieurs études récentes ont démontré la présence d'ADN toxoplasmique dans l'humeur aqueuse de patients présentant des chorioretinites (**Brezin et al, 1991**); (**Aouizerate, et al, 1993**); (**Montoya et al, 1999**) soulignant le passage vraisemblable du parasite du foyer rétinien jusqu'à la chambre antérieure via le vitré (**Cazenave et al, 1994**).

Dans notre étude, la recherche directe du parasite par PCR a été réalisée également sur 12 prélèvements de brebis dont neuf sur 12 sont revenus positifs avec une fréquence de 70%. Cette fréquence varie entre 77 à 84% selon (**Caballero, 2008**) en fonction des zones d'étude et les moyens de dépistage employés. Nous nous sommes intéressés à la race ovine car elle présente une large consommation par l'homme, donc une source primordiale de contamination.

Cette fréquence de parasitisme élevée (70%), est impliquée par le rôle des chats qui généralement défèquent et enterrent leurs excréments dans les zones de stockage de foin et de nourriture. Ainsi que les animaux peuvent être infectés en ingérant des aliments ou de l'eau contaminée par ces excréments.

À la lumière de ces résultats le rôle de la toxoplasmose comme cause fréquente d'avortement infectieux chez les brebis n'est pas négligeable. En effet le parasite *T.gondii* entre dans le flux sanguin des brebis après contamination et se propage à d'autres tissus.

Chez les brebis gestantes, le parasite peut se multiplier au niveau du placenta et passer au fœtus, en causant la mort fœtale, momification, mortinaissance ou naissance d'agneaux faibles ou mal formés (**Weismann et al, 2003**).

Dans certains cas, la gestation peut progresser normalement. Selon plusieurs auteurs, les avortements dus à ce microorganisme surviennent principalement au cours du dernier trimestre de la grossesse et peuvent se produire chez les animaux de tout âge et les grossesses successives. (**Metzger, 2012**). Cette maladie reste méconnue par les éleveurs et incertaine par les vétérinaires dont le diagnostic nécessite une exploration approfondie et une étude histologique ou moléculaire du fœtus et de placenta afin de confirmer le diagnostic de la toxoplasmose.

CONCLUSION

Conclusion

La toxoplasmose est une zoonose cosmopolite due à un parasite intracellulaire obligatoire, *Toxoplasma gondii*. Elle est certainement l'affection parasitaire la plus répandue dans le monde, sévissant sous toutes les latitudes et susceptible d'infecter toutes les espèces animales.

Au terme de notre expérimentation et à travers les résultats obtenus concernant la recherche de l'avidité des IgG et IgM anti-toxoplasmiques, on a noté que 59,03% des femmes étaient non immunisées et 40,97% immunisées.

De notre étude, il ressort que la détermination de l'avidité des IgG et IgM anti-toxoplasmiques par la méthode ELFA avec l'utilisation d'un automate mini VIDAS est fiable et facile à mettre en œuvre.

Le test sérologique doit être effectué précocement ou lors de la déclaration de la grossesse, afin d'éviter une éventuelle séroconversion ainsi qu'une transmission fœtale qui est responsable de lourdes conséquences (avortement, prématurité, malformation, uvéite).

Pour éviter les risques de la toxoplasmose congénitale, la femme enceinte séronégative doit suivre certaines recommandations afin d'en épargner les risques à son fœtus :

Il est conseillé de consommer la viande bien cuite pour éviter l'ingestion possible de kystes de *Toxoplasma gondii*.

De la même façon, une hygiène alimentaire stricte est recommandée (lavage des fruits et légumes).

Enfin, tout contact avec le chat est déconseillé (pour la femme enceinte ainsi que l'alimentation et la litière des animaux de rente).

L'analyse de l'humeur aqueuse par WB ne révèle pas d'anticorps spécifiques, il est utile de réaliser une PCR. Deux éventualités sont à envisager : la PCR est positive, il s'agit bien d'une chorioretinite toxoplasmique ; la PCR est négative, deux solutions sont possibles, la mise en route d'un traitement préventif ou la réalisation d'une seconde ponction de la chambre antérieure.

La PCR effectuée sur les placentas a montré un haut niveau de spécificité pour le diagnostic. Elle permet un diagnostic précoce et doit être recommandé pour l'identification de l'infection congénitale.

L'aspect épidémiologique de la technique en appliquant cette PCR sur divers types de prélèvements (selles, sang, tissus, cordon ombilical) nous a permis d'améliorer nos connaissances sur l'épidémiologie de cette parasitose. En effet, nos résultats révèlent que 75% des sérums de brebis examinés par une PCR classique sont positifs à la toxoplasmose. Cela explique l'importance de l'aspect épidémiologique dans la transmission du parasite à la femme enceinte et du rôle important des chats dans la transmission et la dissémination des oocystes dans divers endroits de

stockage de l'alimentation pour animaux ainsi que le souillage de différents fruits et légumes destinés à la consommation humaine.

Il est important de signaler que la PCR en temps réel ainsi que le séquençage nous permettent d'avoir les géotypes des souches qui restent indispensables dans la connaissance de l'épidémiologie de la maladie et le suivi post thérapeutique.

Au terme de ce travail, nous avons conclu qu'il est important voire impératif d'adopter une politique de prévention et de dépistage, afin de sensibiliser la population sur les conséquences morbides de la toxoplasmose congénitale, et de l'importance du suivi sérologique des femmes séronégatives.

Pour en conclure, nous aimerions également étudier un nombre plus important d'espèces animales largement sollicitées par l'être humain pour la consommation ou pour l'élevage afin d'explorer le statut épidémiologique de la maladie qui reste peu exploité à nos jours (vaches, cheval, volaille) par la technique moléculaire PCR.

REFERENCE
BIBLIOGRAPHIQUE

➤ Les articles :

1. Ajzenberg.D, Banuls.A.L, Tibayrenc.M, Dardé.M.L-Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol*, volume 32, *Issu 1* , January 2002 Page 27-38
2. Ambroise –Thomas.P , Pelloux.H-Le toxoplasme et sa pathologie . *Med Mal infect.*1993, volume 23, n° spécial ; P121-128.
3. Aquizerate,F.J Cazenave,et al(1991)-direct detection of toxoplasma in the aqueous humor by gene amplification.*J.Fr ophtalmo* 114(10):550-5
4. Afssa toxoplasmose:état des connaissances et evaluation du risque lié à l'alimentation
5. Ascburn, Det al .faire IgA ,IgE,IgG,tests d'avidité n'ont aucune valeur dans le diagnostic de l'infection par le toxoplasme pendant la grossesse ,*J ,clin .Pathol*,51 :312-5,1998.
6. Bernier Pinchart ,M.P Mai 2003 la Toxoplasmose 1-7.
7. Black,M.W. and J.C Boothroyd (2000),Lytic cycle of *toxoplasma gondii* 64(3) :607-23
8. Brezin A, P.C.E.Egwuagu et al (1991). Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis, *N Engl J med* 324(10):699.
9. Bretagne S, Costa J-M, fleury faith J, Poron F, debreuil-lemaire M-L, Vidaud M. quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients *J.*1995.33(06):1662-4.
10. Bastien ,Procop ,G. Wet reischel ,U(2008).quantitative real time PCR .*J clin microbial* 46,1997-1900.
11. Berger ,F,Goulet , V,le strat , Y,de Valk ,H,Descenclos ,J-C ,2003 la toxoplasmose en France chez la femme enceinte : Séroprévalence et facteurs associés .institut de veille sanitaire.
12. Bessiéres.M.H Cassaing.S Fillaux .J, Berrebi.A-Toxoplasmose et grossesse . *Rev Fran Lab RFL*. May 2008, Issu 402 :39-50
13. Bessière .M.H, Chemla.C, Bernard. C,Marty.P,Gay-Andrieux .F,Pelloux.H,Rabodonirina.M , Difficulté d'interpretation de la sérologie de la toxoplasmose. *Rev Fran Lab RFL* .June 2006, Issu 383 :39-50
14. Bouratbine.A, Siala. E, Chahed.MK, Aoun.K,Ben Ismail.R. Profil séroépidémiologique de la toxoplasmose au nord de la tunisie.*Parasite*.2001 ;8 :61-6.
15. Chamberland.S,Kirst.HA, Curent.WL-Comparative activity of macrolides against *Toxoplasma gondii* demonstrating utility of an vitro microassay.*antimicrob Agents Chemother* .1991 May;(5):903-9
16. Chalhoub, J2012 .la toxoplasmose, faculté de médecine vétérinaire , Université Libanaise. *dd Hori*
17. Camargo, M.E.; Leser, P.G. & Rocca, A. Rheumatoid factor as cause for false positive IgM anti

- toxoplasmose-fluorescent tests. A technique for specific results. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 33: 310-3, 1972
18. Cozon, GJN et al. Estimation de l'avidité de l'immunoglobuline G pour le diagnostic de routine chronique de *Toxoplasma gondii* infection chez les femmes enceintes. Eur. J. Clin. Microbiol. Infecter. Dis, 17. : 32-6, 199813.
19. Contreras M, L Sandoval, la valeur diagnostique de P. Salinas ELISA IgG, IgM, IgA et IgG ELISA avidité toxoplasmose récente ou chronique. Bull. Chili. Parasitol 2000; . 55: 16-24.
20. Cazenave, J., B. Broussin, et al. (1994). "Contribution of gene amplification in the biological diagnosis of toxoplasmosis." Presse Med 23(12): 573-5.
21. Conyn-van Spaendonck MA, van Knapen F. Choices in preventive strategies: experience with the prevention of congenital toxoplasmosis in The Netherlands. Scand J Infect Dis 1991; 84:51-8.
22. Couvreur J. Le problème de la toxoplasmose congénitale. L'évolution sur quatre décennies. Presse Med 1999; 28:753-7.
23. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Br Med J 2000; 321:142-7.
24. Costa, J. M., Pautas, C., Ernault, P., Foulet, F., Cordonnier, C. & Bretagne, S. (2000). Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J Clin Microbiol* 38, 2929-2932.
- Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Peruzzi, S., Zerbini, L., Bommezzadri, S., Dettori, G. & Chezzi, C. (2006). Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed* 77, 75-80
25. Cassaing, S., Bessières, M. H., Berry, A., Berrebi, A., Fabre, R. & Magnaval, J. F. (2006). Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 44, 720-724. [Abstract/FREE Full Text](#).
26. Chabbert, E., Lachaud, L., Crobu, L. & Bastien, P. (2004). Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood and tissues. *J Clin Microbiol* 42, 1719-1722.
27. Dr Marie-Hélène Bessières, CHU de Rangueil, Toulouse, France.
28. Chartier .C,MP.Mallereau.2001.Efficacité vaccinale de la souche S48 de *Toxoplasma godii* vis-à-vis d'une infection expérimentale chez la chèvre laboratoire d'étude et de recherche caprines.

29. Chandener J, Jarry G, Nassif D, Douadi Y, Paris L, Thuliez P, Bourges-Petit E, Racourt C- Congestive heart failure and myocarditis after seroconversion for toxoplasmosis in two immunocompetent patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 May;19(5):375-9
30. Chang HR, Pechère JC- in vitro effects of four macrolides (roxythromycin, spiramycine, azithromycin (CP-62,993, and A-56268) on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob agents Chemother*. 1988 Apr;32(4):524-9.
31. Chiquet C, Fleury J, Blanco-Jouvan M, Wallon M, Boibieux A- Acquired ocular toxoplasmosis (panuveitis) after liver transplantation. *J Fr Ophtalmol*. 2000 Apr;23(04):375-9.
32. Dardé ML- Consequence de la biodiversité du toxoplasme. *la lettre de l'infectiologue* 2002, tome XVII n°7
33. Dubey JP, and Beattie CP- *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 52, 1988; 232-236.
34. Dubey JP- Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *int J Parasitol* 28(1998)1019-1024.
35. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Peterson E, Peckham C, Gilbert R- Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimate of clinical counseling. *The Lancet*, volume 353, Issue 9197, 29 May 1999, pages 1829-1833.
36. Dupouy-Carmet J, Gavinet M-F, Paugam A, Tourte Schafer CL- *Mode infect*. 1993. volume 23, n° spécial ; p139-147.
37. Dubey JP, Beattie CP. 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC press, 1220.
38. Derouin, F.T., P. Romand, S. Lecolier. (2000). « La Toxoplasmose chez l'homme. Diagnostic, Prévention et traitement. Supplément au Laborama, N°35 :32.
39. Derouin, F.T., P. Romand, S. Lecolier. (2000). « La Toxoplasmose chez l'homme. Diagnostic, Prévention et traitement. Supplément au Laborama, N°35 :32.
40. Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzymic characterization of 7 strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocalisation in polyacrylamide gels. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;39:551-58.
41. Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol*. 1992;8:786-94.
42. Desmonts, G., J. Couvreur, F. Alison, J. Baudelot, J. Gerbeaux, M. Lelong (1965). "Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection." *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol*. 10: 952-958.
43. Desmonts, G. (1973). "Ocular toxoplasmosis: epidemiologic study (report on 2030 examinations of the aqueous humor)." *Arch Ophtalmol Rev Gen Ophtalmol* 133(2): 87-102.

44. Dunn D, M Wallon, Peyron F, E Petersen, Peckham C, Gilbert G 1999. La transmission mère-enfant de la toxoplasmose: Estimations de risque de counseling clinique Lancet 353: 1829 à 1833.
45. Dr J. Franck et al, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Marseille.
46. Edvinsson, B., Lappalainen, M. & Evengård, B. on behalf of the ESCMID Study Group for Toxoplasmosis (2006). Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect* **12**, 131–136
47. El Mansouri.B, M. Rajaoui, f. Sebti et al-séroprévalence de latoxoplasmose chez la femme enceinte dans la ville de Rabat au Maroc.Bull Soc PatholExot,2007,100,4,289-290.
48. Fleger.J, Prandota.J, Sovickova.M, Israili.ZH-Toxoplasmosis-a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. Plos one.2014 Mar 24;9(3).
49. Flori.P,Hafid.J, Bourlet . T, Raberin.H ,Genin.C , Sung.RT-Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs:use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. J Med microbial.2002 Oct ;51(10):871-8.
50. Forestier.F, Vidaud.M, Costa.JM,Jaquemars.F,Daffos.F-Diagnostic prenatal de la toxoplasmose congénital.immunoanalBiolSpec (1992)33,27-31.
51. Fricker –Hidalogo.H,Pelloux.H,Racinet.C,Grefenstette.I,C. Bost-Bru.C,Goullier-Fleuret.A, Ambroise-Thomas.P-Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placenta from infected women by polymerase chain reaction,in vivo,and in vitro cultures.Placenta,Volume 19, Issue 7 September 1998, Pages 545.
52. Ferguson, D.J.,A.Birch-Anderson et al. (1978). "Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*". *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 86 B (3): 165-7.
53. Ferguson, D.J.,A.Birch-Anderson et al. (1978). "Observations on the ultrastructure of the sporocyst and the initiation of sporozoite formation in *Toxoplasma gondii*". *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 86 B (3): 165-7.
54. Gavinet.MF,Robert.F, Firtion.G, Delouvrier.E, Hennequin. C,Maurin.JR,Tourte-Shaefer.C,Dupouy-Carmet.J-Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. J ClinMicrobiol.1997 May; 35(5):1276-7.
55. Gonzalez-Morales.T, Bacallo-Gallestey.J, Garcia-Santana.CA, Molina-Garcia.JR. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in a population of pregnant women in Cuba.Gac Med Mex.1995; 131:499-503.

56. Hitt.JA, Filice.GA-Detection of toxoplasma gondii parasitemia by gene amplification ,cell culture , and mouse inoculation. J ClinMicrobiol.1992 Dec;30(12)3181-4
57. Hohlfeld.P- La toxoplasmose:Conséquence pédiatriques du diagnostic anténatal. Arch Pediatr 1999 ;6 Suppl :238-40 P.
58. Hans JC.1982-Ann :Med.Vet .p 126,441,474.
59. Jones . JL, Kruszon-Moran.D, Wilson.M, McQuillan.G, Navin.T,McAuley.JB. Toxoplasma gondii infection in the United State; seroprevalence and risk factors . Am J Epidemiol.2001;154:357-65.
60. Julvez.J, Magnaval.JF, Meynard. D, Perie .C, Baiench.MT-Seroepidemiology of toxoplasmosis in Niamey, Niger.Med Trop(mars).1996;56(1):48-50.
61. JOURDY, M.2014.La prévention de la toxoplasmose pendant la grossesse, connaissances et mis en application de méthodes de prévention. Diplôme d'Etat de Sage-Femme Clermont-Ferrand, Université d'Auvergn-Clermont 1, 88.
62. Janku, J. (1923). "Pathogénèse et anatomo-pathologie de la macula dans un œil de dimension normale et dans un œil microphthalmal avec parasites dans la rétine." Casopis Lekarů Ceskoslovenska 62: 1021-1027.
63. Judith Weissmann Presumptive Toxoplasma gondii abortion in a sheep Can Vet J. ; 44(4): 322–324(2003)
64. Hutchinson, W. M., J.F. Dunachie, J.C. Siim, K. Work, (1970). "Coccidianlike nature of toxoplasma gondii." Br. Med. J. 1: 142-144.
65. <http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=toxoplasmose-pm-prevention->
Hierl, T., Reischl, U., Lang, P., Hebart, H., Stark, M., Kyme, P. & Autenrieth, I. B. (2004). Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. *J Med Microbiol* 53, 629–632
66. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, 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;30:69-75.
67. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a Polymerase-Chain-Reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med. 1994;15:695-9.
68. Garweg, J. G., P. Jacquier, et al. (2000). "Early aqueous humor analysis in patients with human

- ocular toxoplasmosis." J Clin Microbiol 138(3): 996-1001.
69. Kasper L., Courrent N, Darche S .et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. Int. J. Parasitol. 2004, 34:401-9
70. Kravetz .JD, Federman. DG-Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors .infect Dis Obstet Gynecol. 2005 Sep; 13(3):161-5.
71. Lee .YH, Noh .HJ, Hwang. OS, Lee. SK, Shin. DW. Seroepidemiological Study of *Toxoplasma gondii* infection in the rural area Okcheon-gun, Korea. Korean J Parasitol. 2000; 38:251-6.
72. Marty .P, et al. toxoplasmose congénitale mortelle consécutive à une toxoplasmose de réactivation survenue chez une parturiente séropositive pour le VIH. La presse médicale 2002, tome 31, n°33 :1558-1567.*
73. Mike Metzger , Michigan State University Extension 2012
74. Morris. A, Croxon. M. serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Auckland. N Z Med J. 2004; 117:U770
75. Moussa .DA, Mohammed. MA, Tobali. AB. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women with previous adverse .Med J Islam World Acad Sci 2011; 19:95-102.
76. Manuel terrestre de l'OIE. Chapitre 2.9.10.-Toxoplasmose : 1406-1413. (définition toxoplasmose)
77. Makuwa. M, Lecko. M, Nsimba .B, Bakouetella. J, Lounana. K (1992) : Toxoplasmose et la femme enceinte au Congo.
78. McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M et al. Early and longitudinal evaluation of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago collaborative treatment trial. Clin Infect Dis 1994; 18:38-72.
79. Montoya, J. G., S. Parmley, et al. (1999). "Use of the polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis." Ophthalmology 106(8): 1554-63.
80. Nicolle, C., L. Manceaux (1909). "Sur un protozoaire nouveau du *Toxoplasma gondii* n.g." Archives de l'Institut Pasteur de Tunis 1: 97-103.
81. ONAJA, M., S. 2009. Diplôme d'Etudes Approfondies en Biochimie/Biologie Moléculaire : Unité de Formation et de Recherche Sciences de la Vie et de la Terre (VFR-SVT). Burkina-Faso, Université de Ouagadougou, 67.
- Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Jr HF, Del Negro GM. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. Clinics 2009; 64:171-176.

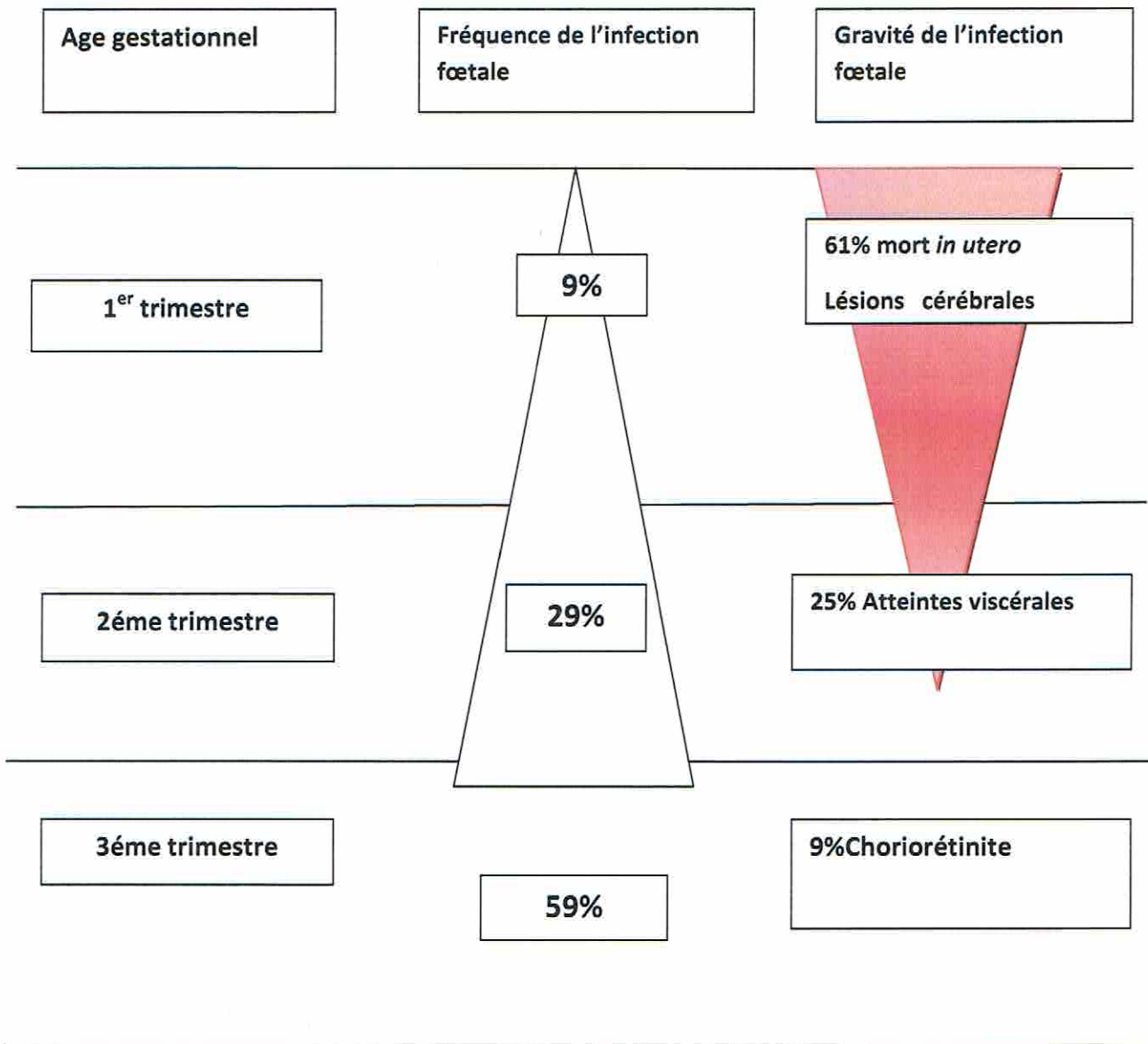
82. Ndumbe .PM, Andela.A,Nkemnkeng-Asong.J, Watonsi.E, Nyambi.P.Prevalence of infections affecting the child among pregnant women in yaounde,Cameroun.Med Microbioimmunol (Berl).1992;181:127-30.
83. Nicolas.J, Pester-Alexandre.M- toxoplasmose ,une zoonose transmissible à l'homme. Med mal infect, volume 23, n°spécial 1993.
84. Nissapatorn .V, Noor Azmi.MA, Cho.SM, Fong.MY, int I , Rohela M,khairulanuar.A, Quek.KF, Latt.HM. Toxoplasmosis prevalence and risk factors .J Obstet Gynaecol.2003 ;23 :618-24.
85. Nozai .JP-Traité de parasitologie médicale Edition paradel ;1996, p 818.
86. Onadeko .MO,Joynson.DH, Payn.RA, Francis.J.the prevalence of Toxoplasma antibodies in pregnant nigeria women and the occurrence of stillbirth and congénital malformation.Afr J Med sci.1996;25:331-4.
87. Pinon .JM,Dumon.H,Chemla. Cetcoll- strataegy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and stand methods for postnatal detection of immunoglobulin GM, and antibodies. J ClinMicrobiol. 2001 jun;39(6):2267-71.
88. Pelloux H, Dupouy-Camet J, Derouin F, Alboulker J-P, Raffi F. A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. Bio-Toxo Study Group. AIDS. 1997;11(15):1888-90.
89. Pr. J.M. Pinon et al, Laboratoire de Parasitologie, Hôpital Maison Blanche, Reims.
90. Pr. M. Huerre et al, Institut Pasteur, Paris.
91. Payeur, G., J. C. Bijon, et al. (1988). "Diagnosis of ocular toxoplasmosis by the ELISA method applied to the determination of immunoglobulins of the aqueous humor." J Fr Ophtalmo 111(1): 75-9.
92. Pappas G, Roussos N, E. Falagas M. Toxoplasmosis snapshots: Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. International journal for Parasitology 2009 ; 39 : 1385–94.
93. Rapport Afssa 2005-AFSSA.Toxoplasmose : étape des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail « Toxoplasma gondii » de l'Afssa Décembre 2005.
94. Remington, J. S., F. G. Araujo, et al. (1985). "Recognition of different Toxoplasma antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns." J Infect Dis 152(5): 1020-
95. Riss, J. M., M. E. Carboni, et al. (1995). "Ocular toxoplasmosis: value of immunoblotting for

- the determination of an intra-ocular synthesis of antibodies." *Pathol Biol (Paris)* 43(9): 772-8.
- Remington JS, McLeod R, Thulliez P, et al. Toxoplasmosis. In :Remington JS,Klein JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001:205.
96. Rilling, V., K. Dietz, D. Krczal, F. Knotek, and G. Enders. 2003. Evaluation of a commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22:174-180. CrossRefMedline
97. Reischl, U., Bretagne, S., Kruger, D., Ernault, P. & Costa, J. M. (2003). Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 3, 7
98. Robert-gangneux .F , Kieffer . F, prise en charge diagnostique et thérapeutique de la toxoplasmose congénitale . la lettre de l'infectiologue 2001, Tome XVI , N° 5/143-151.
99. Roberts .F, Mcleod.R- pathogenesis of toxoplasma retinochorioiditis parasitol today , Volume 15, Issu 2,1 February 1999, Pages 51-57.
100. Romand .S, Wallon.M, Frankel .J , Thulliez . P, Peyron .F , Dumon.H-Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstetrics and gynecology*, Volume 97, Issue 2, February 2001:296-300.
101. Romands .S,Thulliez.P- Diagnostic antenatal de la toxoplasmose . *Rev Fran Lab RFL*, Volume 2003, Issue 353, May 2003, Pages 61-65.
102. Sabin, A. B., H. Feldman (1948). "Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma)." *Science* 108: 660-663.
103. Tissot -Dupont, D., H. Fricker-Hidalgo, M. P. Brenier-Pinchart, C. Bost-Bru, P. Ambroise-Thomas, and H. Pelloux. 2003. Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22:122-125. Medline.
104. Thelliez, 1993, "Diagnostic biologique de la toxoplasmose oculaire. Etude des différents isotypes spécifiques de l'humeur aqueuse." Thèse de médecine Reims.
105. Tender, A.M, A.R. Heckeroth, et coll. (2000). "Toxoplasma gondii: From animals to humans" *Int J Parasitol* 30 (12-13): 1217-58.
106. Wolf, A., D. Cowen (1937). "Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (Encephalitozoic encephalomyelitis)." *Bulletin of Neurology Institut N.Y.* 6: 306-371.
107. Tenter .AM , Heckroth A.R, Weiss L.M-T toxoplasma gondii; from animals to humans , *Int J Parasitol.* 3(12-13)(2000)1217-1258.

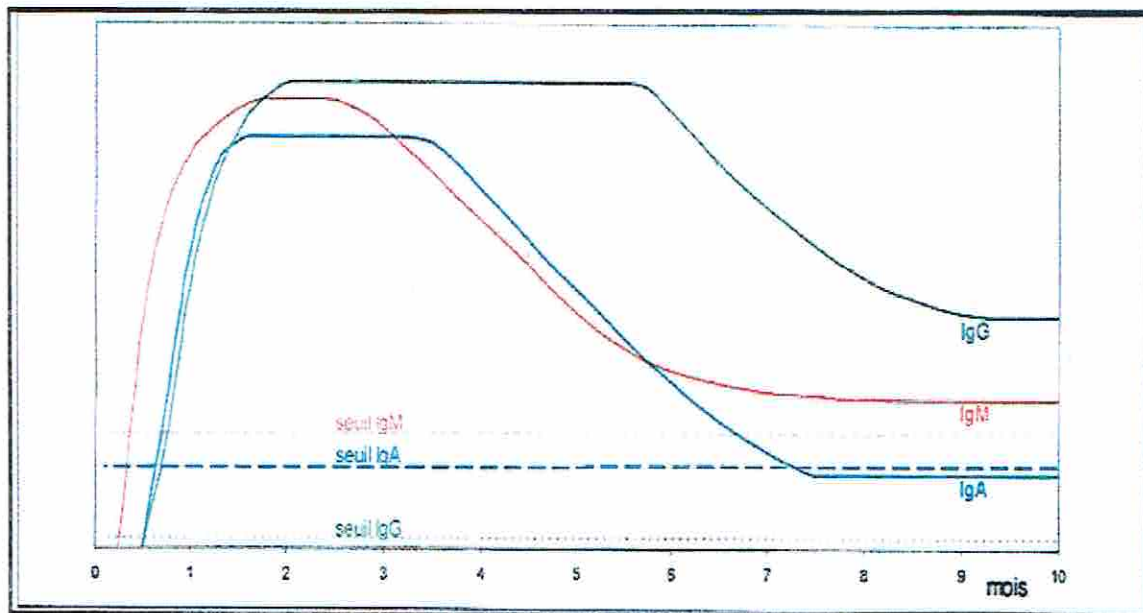
108. Tomavo .S- The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii* ; an adaptive developmental strategy INT J Parasitol , volume 31, issue 10, August 2001, 1023-1031 Toxoplasmosis. Immunology, 1995,84:16-20.
109. Villena .I, Quereux .C, Pinon .J.M- Congenital toxoplasmosis : value of prenatal treatment .prenatal diagnosis ,volume 18,issue 7 , Date ;July 1998,pages ;754-756.
110. Villena .I Bory .J.P, Chemla .C, Hornoy.P, Pinon.J.M- Congénital toxoplasmosis : necessity of clinical and ultrasound Follow-up despite negative amniocentesis.prenatal diagnosis .Volume 23, issue 13,date:30 decembre 2003:1098-1099.
111. Weyers M.1977.Le praticien veterinaire et la Toxoplasmose.Rec vet 153(1),13-17.
- **Les ouvrages:**
112. Afssa –Toxoplasmose ; état des connaissances et evaluation du risqué lié à l'alimentation – rapport du groupe de travail *Toxoplasma gondii* de l'afssa,2005, p 328.
- 113. Caballero-Ortega H1, Quiroz-Romero H, Olazarán-Jenkins S, Correa D**
2008 Jul, Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. ; Parasitology. 135(8):897-902.
114. Fortier .B, Dao.A ,Ajana.F-Toxoplasme et toxoplasmose .Encyclopédie médical CHIR (édition scientifiques et médicales Elsevier SAS, paris , tous droit réservés),Maladies infectieuses,8-509-A-10,4-330-A-10 ,2000,p13.
115. Golvan . Y.J, Ambroise –Thomas . P-Les nouvelles techniques en parasitologie et immunoparasitologie . Flammarion, 1990, p306.
116. Moulinier .C-Parasitologie et mycologie médicale « elements de morphologie et de biologie >> Edition médicales internationales ; Lavoisier 2003, p796.
117. Ripert .C-Epidémiologie des maladies parasitaires, Tome 1 :Protozooses Edition médicales internationales ;1996,p394.
- **Thèses :**
118. Mezghiche .N ,Nouassria .A, Séroprévalence de la toxoplasmose chez la femme enceinte au CNR toxoplasmose a l'institut pasteur , thèse d'obtention du diplôme de docteur en pharmacie 2016/2017
119. Benyahia .N , séroprévalence de la Toxoplasmose chez les femmes maries en âge de procréer dans la région de Batna ,thèse d'obtention de diplôme de magistère en science vétérinaire

ANNEXES

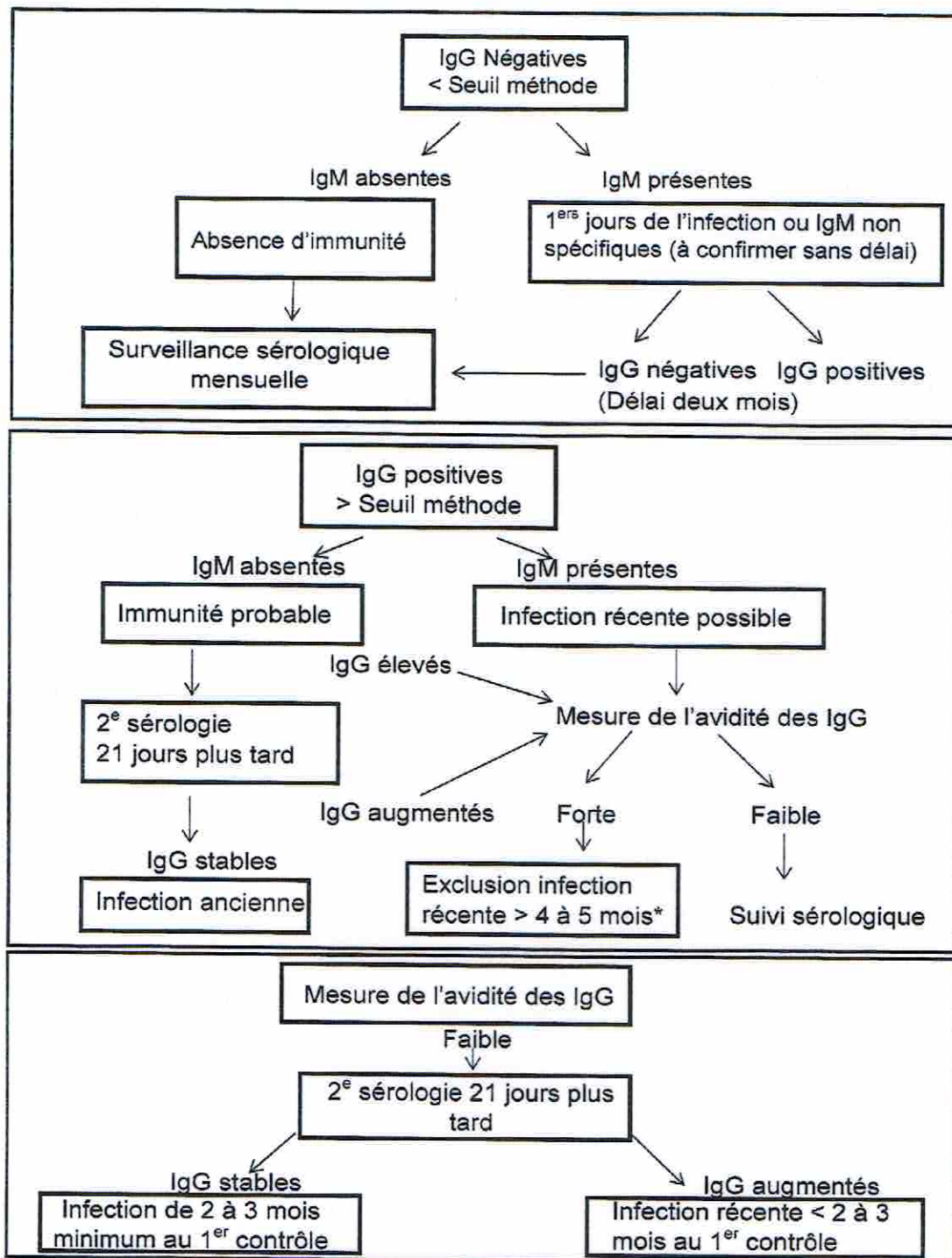
Annexe 01 : Schéma représentant le risque de transmission parasitaire et la gravité de l'atteinte fœtale au cours d'une primo-infection toxoplasmique chez la femme enceinte (Dunn, Wallon et al 1999).



Annexe 02 : Cinétique d'évolution des anticorps IgG, IgM et IgA au cours d'une toxoplasmose évolutive (Bessièrres, Chemla et al 2006).



Annexe 03 : Algorithme résumant la conduite à tenir devant une sérologie toxoplasmique chez une femme enceinte (Cassaing et al, 2008).



Annexe 04 : Coffret d'extraction Qiamp DNA Mini Kit Qiagen Tissu et Sang.

- Tampon de lyse (AL) (13 ml)
 - Tampon de lavage 1 (AW1) (13 ml)
 - Tampon de lavage 2 (AW2) (19 ml)
 - Protéinase K
 - Colonne et poubelle Qiagen
 - Tampon AE
 - Tampon ATL (10 ml)
 - Tampon BL2 (25 ml)
- } Réactif utilisé pour le tissu et le sang
- } Réactif utilisé pour le tissu

Annexe 05 : Composition du Coffret de l'extracteur automatique

- Chambre de réaction 24 pcs (6×4)
- Elut tube (50 pcs)
- Piercing Pin (50 pcs)
- Filter Tip (50 pcs)
- Sample tube (50 pcs)
- Reagent cartridge 24 pcs (4×6)

Annex 06: Composition du Coffret Toxoplasma Western blot IgG IgM (LDBIO Diagnostics)

- Une pochette de 24 bandelettes sensibilisées (bandelettes de nitrocellulose numérotées)
- Un flacon de diluant d'échantillons (30 ml)
- Un flacon de tampon de lavage (60 ml)
- Un flacon de conjugué anti-IgG (30 ml)
- Un tube contenant de sérum de contrôle positif (100 ml)
- Un flacon contenant de substrat (30 ml)

Annexe 07 : Composition du Coffret VIDAS Toxo IgG II (BioMérieux SA)

- 60 cartouches TXG (10 puits)
- 60 cônes Toxo IgG
- Contrôle positif TXG = C1 2 ml
- Contrôle négatif TXG = C2 2 ml

- Calibrateur TXG = S1 1 ml
- Une carte MLE

Annexe 08 : Préparation du témoin positif

La préparation d'un témoin positif est réalisée selon les étapes suivantes :

1. Injecter à une souris, 0,2 ml de tachyzoïtes de *T. Gondii* par voie intra péritonéale en utilisant une seringue de 1 ml
2. Quatre jours plus tard on sacrifie la souris,
3. Poser les souris sur le dos sur un morceau de liège. Nettoyer la paroi abdominale avec une solution aseptique, recueillir le liquide péritonéal par une seringue de 1 ml et transférer l'exsudat obtenu dans un volume équivalent de PBS. Le délai optimal pour recueillir les tachyzoïtes est de 72h après l'inoculation car au-delà le taux des tachyzoïtes diminue.
4. Centrifugation 2500tr/min
5. Lavage PBS
6. Re-Suspensions du culot dans un volume de TE (TRIS /EDTA)



souris RH(BALBc) (originale) (CNR Toxoplasmose)



Tachyzoïtes de *toxoplasma gondii*(ASCP 1985)

Annexe 09 : Méthode d'extraction d'ADN de *Toxoplasma gondii* des selles par la méthode Kit Qiagen Stools

- Prendre une noix de 200 micros litre de selle dans un éppendorf
- Rajouté 1,4 ml de buffer ASL
- Vortexer 15 secondes
- Chauffage a 70° C (bain marie) pendant 5 minutes en mettant les éppendorf dans des portoirs
- Centrifugation du contenu pendant 3minutes a une vitesse de 1000 tours /mn

- Vortexer a une vitesse maximale 1 mn (selles +AW1)
- Centrifugation pendant 1 mn
- Après centrifugation prendre 1,2 ml du surnageant dans des éppendorfs propres et rajouté dans chacun un comprimé d'hinibex dans chacune et mettre a vortexer pendant une minute pour dissoudre le comprimé
- Incubation de la solution 1 mn a température ambiante (cette étape permet a l'hinibex d'absorbé la matrice.
- Centrifuger 3 mn pour avoir une liaison entre les inhibiteurs et la matrice
- Pipeter tout le surnageant après centrifugation dans des éppendorfs de 1.5 ml
- Centrifuger 3mn a une vitesse maximale sup 10000 tours /mn
- Prendre 200 micro litre du surnageant et ajout 20 micro litre de la protéase K (son max d'activité a 56° C) cé une enzyme pour détruire les kyste parasites et extraction d'ADN +ajouté 200 micro litre du tampon AL ensuite vortexer pendant 15 secondes
- Incubation 56°C /20 mn puis 70 °C dans un bain marie pendant 10mn.

(Protéase + tampon pour la lyse des constituants cellulaires ou parasites)

- Récupération du surnageant du bain marie et ajouté 200 micro litre de méthanol 96°0/0 a une température 20°C et vortexer
- Ensuite placer le contenu (surnageant) dans des tubes spécifique a filtre (kits) contenant des collecteurs et centrifugé a 14000 tours pendant 3 minutes .
- Récupéré le centrifugat et changer les tubes collecteurs et ajout de 500 micro litre de la solution AW1 (kit) et remettre a la centrifugation maximale 14000 tours pendant 3 vmn.
- Récupération du centrifugat contenant l'ADN et jeter les tubes collecteurs et placer dans des eppendorfs (les filtres seulement) et ajouté 300 micro litre du tampon buffer AE (kits stools) , centrifugé à vitesse maximale .

Récupéré les eppendorfs et jeter les filtres et on obtient 3 ml d'une solution ADN.

Résumé :

La Toxoplasmose est une anthroponose cosmopolite, très fréquente chez l'homme, elle est souvent bénigne, toutefois elle peut être à l'origine de complication fœtales grave si elle survient chez la femme enceinte ainsi que l'animal.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'aspect sérologique de la Toxoplasmose concernant 393 prélèvements chez la femme enceinte au niveau CHA par la technique ELFA(miniVIDAS),et une comparaison de profils sérologique des couples mère/enfant et humeur aqueuse par la technique Western Blot pour la confirmation de la Toxoplasmose congénital et oculaire .La recherche du parasite à été effectuée par le teste de confirmation PCR des différentes liquides biologiques et tissus, et l'aspect épidémiologique de la maladie par examen des selles de chats et brebis par la PCR.

Nos résultats ont aboutit, que des 393 femmes examinés : 59,03% sont non immunisées nécessitant des contrôle mensuelles, et 40,97% sont immunisées au risque de séroconversions.

L'analyse des couples de sérums : mère/enfants et humeur aqueuse révèle des résultats positifs mais négatif par l'examen PCR, mais cela n'exclut pas une atteinte oculaire.

Les 2% (8/161) présentant une séroconversion avec IgG/IgM positif, la recherche de l'ADN anti toxoplasmiques dans le placenta, révèle 4 placentas positif (50%), dont deux présentés une affection fœtale (toxoplasmose congénitale).

La PCR du sang de brebis révèle 70% de cas positifs indiquant l'importance de l'aspect épidémiologique de la maladie et l'importance du chat dans la transmission des oocystes dans l'environnement et cela en indiquant des résultats positifs à la PCR (examen d'ADN de 12 selles de chats révéle positifs)

Mots clés : Séroprévalence de la Toxoplasmose, Toxoplasmose congénitale, Séroconversion Technique ELFA et PCR. Western Blot

Abstract:

Toxoplasma is a cosmopolitan anthroponosis, very common in humans; it is often benign, however it can be the cause of serious fetal complication if it occurs in the pregnant woman as well as the animal.

The aim of our study is to investigate the serological status of toxoplasmosis for 393specimens in pregnant women at the CHA level by ELFA (mini VIDAS), and a comparison of serological profiles of mother pairs and aqueous humor the western blot technique for confirmation of congenital and ocular Toxoplasmosis .

The parasite search was carried out by the PCR confirmation test of the various biological fluids and tissues. And the epidemiological aspect of the disease by the examining the stools of cats and bloods cheep by the same exam PCR.

Our results showed that of 393women examined: 59,03% are unimmunized requiring monthly controls ,and 40.97% are immunized at the risk of seroconversions ,Analysis of pairs of sera :mother/child and aqueous humor revealed positive but negative results by PCR,but this does not exclude ocular involvement.

The 2%(8/161) seroconversion with positive IgM/IgG,the search of anti-toxoplasmic DNA in the placenta, revealed 4positif placentas(50%),two of which presented a fatal condition(congenital toxoplasmosis).the sheep blood PCR revealed 70% of positive cases indicating the importance of the epidemiological aspect of the disease and the importance of the cat in the transmission of oocysts in the environment (examination of 12 DNA cats extraction was positives)

Keywords: Seroprevalence of Toxoplasmosis, congenital Toxoplasmosis, Seroconversion, ELFA and PCR technique, Western Blot (immunoblot).

ملخص:

أهداف دراستنا تحوم نحو تحديد إصابة بمرض القويسات (توكسوبلازموس) عند النساء الحوامل و كشف مختلف طرق العدوى الممكنة و ذلك على مستوى المستشفى المركزي العسكري لـ 393 حالة .

وقمنا بالعمليات الإستكشافية التالية بطريقة تحديد المصل المضاد بطريقة ELFA (بالعتاد التالي (VIDAS) والذي كان دقيقا و نافعا، ثم المقارنة بين مصل الأم و المولود و كذا مصل الرضيع / عينة من القرنية بتقنية وسترن بلوت (WB) و أعطت نتائج إيجابية و لكن نتائج سلبية بالتقنية الدقيقة PCR، و كذا قمنا بأخذ عينات من مصل النعج و الذي أعطت نتائج موجبة 70 % بتقنية PCR و كذا عينات من براز القطط و التي أعطت نتائج موجبة بنفس التقنية و هذا يرشدنا في التعرف على وسائل نقل العدوى من الحيوان إلى الإنسان بصفة دقيقة

يستلزم إجباريا على النساء الحوامل القيام بالتحاليل اللازمة خاصة النساء اللواتي يحملن المصل الناقص بإجراء تحاليل شهرية و كذا الحملات للمصل الإيجابي و ذلك مسبقا للإصابة لهذه العدوى الخطيرة التي تؤدي إلى هلاك الجنين أو الإصابة بالعمى سواء للإنسان أو الحيوان .