



**INSTITUT
DE VEILLE SANITAIRE**

Surveiller, alerter, prévenir

**Extrait du Dossier de candidature en vue du
renouvellement du CNR de la Toxoplasmose
pour le mandat 2012-2016**

Pr I. VILLENA

Coordonnateur du CNR Toxoplasmose

Laboratoire de Parasitologie

Hôpital Maison Blanche

45, rue Cognacq Jay

51092 REIMS CEDEX

A. FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE

COORDONNEES DU LABORATOIRE CANDIDAT

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
Hôpital Maison Blanche, 45, rue Cognacq Jay
51092 REIMS CEDEX

nom et coordonnées du responsable scientifique

Pr Isabelle VILLENA
Laboratoire de Parasitologie
Hôpital Maison Blanche, 45, rue Cognacq Jay
51092 REIMS CEDEX
Tel : 03 26 78 42 20 FAX : 03 26 78 73 28
ivillena@chu-reims.fr

nom et coordonnées du responsable administratif

M. S. GROSEIL
Direction des Affaires Financières
Hôpital Maison Blanche, 45, rue Cognacq Jay
51092 REIMS CEDEX
Tel : 03 26 78 92 64 FAX: 03 26 83 25 27
sgroseil@chu-reims.fr

LABORATOIRE ASSOCIE POLE SOUCHES

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
CHU Dupuytren, 2 Avenue Martin Luther King
87042 LIMOGES CEDEX

nom et coordonnées du responsable scientifique

Pr Marie-Laure DARDE
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
CHU Dupuytren, 2 Avenue Martin Luther King
87042 LIMOGES CEDEX
Tél : 05 55 05 61 60 FAX : 05 55 05 61 77
marie-laure.darde@unilim.fr

nom et coordonnées du responsable administratif

M. Hamid SIAHMED
CHU Dupuytren, 2 Avenue Martin Luther King
87042 LIMOGES CEDEX
Tél : 05 55 05 55 55
Hamid.siahmed@chu-limoges.fr

LABORATOIRE ASSOCIE POLE SEROLOGIE

Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale
Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale
3, rue Koeberlé
67000 STRASBOURG
Tél. 03 68 85 37 00 ; Fax 03 68 85 38 09

nom et coordonnées du responsable scientifique

Prof. Ermanno CANDOLFI
Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale
Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale
3, rue Koeberlé
67000 STRASBOURG
Tél. 03 68 85 37 00 ; Fax 03 68 85 38 09

nom et coordonnées du responsable administratif

M. Gilles ROMEROWSKI
Université de Strasbourg,
4 rue Blaise Pascal,
F - 67081 Strasbourg Cedex
Tél. : 03.68.85.11.63
Fax : 03.88.41.43.10
g.romerowski@unistra.fr

LABORATOIRE ASSOCIE POLE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Département de Parasitologie-Mycologie,
CHRU de Montpellier / UFR Médecine (Université Montpellier 1)
39 Avenue Charles Flahault (site Antonin Balmès)
34295 Montpellier Cedex 5, France.
Tel : 0467 33 23 50 ; Fax : 0467 33 23 58
Site Internet : <http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/>

nom et coordonnées du responsable scientifique

Prof. Patrick BASTIEN
Département de Parasitologie-Mycologie,
CHRU de Montpellier / UFR Médecine (Université Montpellier 1)
39 Avenue Charles Flahault (site Antonin Balmès)
34295 Montpellier Cedex 5, France.
Tel : 0467 33 23 50 ; Fax : 0467 33 23 58
e-mail : p-bastien@chu-montpellier.fr

Nom et coordonnées du responsable administratif :

Pôle : M. Robert AMIER (Cadre administratif Pôle Biologie-Pathologie)
Adresse : CHRU de Montpellier, Hôpital St ELOI
80 avenue A. Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5
Tél. : 04.67.33.70.06 ; Fax : 04.67.33.76.04 ;
e-mail : r-amier@chu-montpellier.fr

B.1 Présentation de l'état de la question scientifique et des enjeux de santé publique

La toxoplasmose est une zoonose transmissible à l'homme et aux animaux (à sang chaud), fréquente et transmise par un parasite protozoaire ubiquitaire *Toxoplasma gondii*. La toxoplasmose est l'une des infections les plus prévalentes en France avec des valeurs de séroprévalence chez l'adulte comprises entre 30 et 60%, variables suivant l'âge, la région géographique et la catégorie socioprofessionnelle. La séroprévalence a varié considérablement depuis 30 ans avec une baisse de prévalence régulière. Ainsi la séroprévalence moyenne a été estimée à 54,3% dans l'enquête nationale périnatale de 1995 (Ancelle, 1996) et à 43,8% en 2003 (Berger, 2005). L'incidence de la toxoplasmose dans la population générale est difficile à évaluer car l'infection est le plus souvent asymptomatique. En France, le nombre annuel de nouvelles infections, estimé par modélisation en se basant sur les données de prévalence de l'enquête Périnatalité 1995, est compris entre 200 000 et 300 000 cas avec environ 30 000 à 45 000 cas symptomatiques. Généralement bénigne pour l'homme, cette maladie peut cependant être grave dans certaines circonstances :

1/ Chez la femme enceinte, la primo-infection toxoplasmique peut être transmise au fœtus et être à l'origine de la toxoplasmose congénitale pouvant entraîner de graves séquelles. Les formes inapparentes paraissent les plus fréquentes à l'heure actuelle mais leur pronostic évolutif demeure incertain (risque de chorioretinites ultérieur). La fréquence et la gravité des toxoplasmoses congénitales ont conduit à la mise en place d'un programme national de dépistage sérologique systématique chez la femme enceinte, avec émission de recommandations de prévention par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France sans évaluation de ce dernier jusqu'en 2007.

2/ Chez les malades immunodéprimés, la toxoplasmose est particulièrement sévère, mortelle sans traitement. Elle correspond le plus souvent à la réactivation d'une infection antérieurement acquise. La forte prévalence de la toxoplasmose en France dans la population générale explique la très forte incidence de la toxoplasmose au cours du SIDA avec une diminution des cas observés depuis l'introduction de la chimioprophylaxie et des nouveaux traitements antiviraux. Cependant, ce risque demeure pour d'autres types d'immunodépression (patients atteints de cancer, patients greffés).

3/ Chez le patient immunocompétent, des formes graves avec détresse respiratoire aiguë, voire des formes mortelles ont été décrites notamment en Guyane Française (Carme, 2009 ; Demar, 2007). Des formes graves ont aussi été décrites, bien que plus exceptionnellement, sur le territoire métropolitain. Les souches à l'origine de ces cas sévères sont génétiquement différentes de celles circulant habituellement en France métropolitaine (Delhaes, 2010 ; De Salvador-Guillouet, 2006).

Le diagnostic de la toxoplasmose repose principalement sur l'étude immunologique. La recherche du parasite ou de son ADN est réalisée chez les patients immunodéprimés, les patients immunocompétents en cas de toxoplasmose virulente, chez les femmes enceintes au décours d'une séroconversion et chez les enfants suspects de toxoplasmose congénitale à la naissance. Actuellement, de nombreux laboratoires français (hospitaliers et privés) ont acquis une expertise technique en matière de diagnostic sérologique, cependant le diagnostic par biologie moléculaire reste encore peu développé et non standardisé. Appliqué au diagnostic anténatal, il est réservé à 23 laboratoires agréés en France. La détection du parasite par inoculation à la souris reste une méthode sensible et spécifique, mais longue et lourde, réservée à quelques laboratoires spécialisés disposant d'une animalerie, elle a l'avantage d'isoler la souche responsable de l'infection pour permettre sa caractérisation. Malgré la diffusion des compétences et de l'expertise, il est très difficile d'avoir une évaluation précise de l'incidence, de la prévalence de la toxoplasmose et de l'efficacité des mesures de prévention ou de dépistage mises en place, ainsi que de l'évaluation de l'efficacité du traitement (en particulier de la toxoplasmose congénitale) conduisant à une incertitude préjudiciable en terme de prise en charge des patients. Par ailleurs, la compréhension de la circulation du parasite dans l'environnement y compris chez les animaux de rente ou sauvages susceptibles de contaminer la population humaine, est encore incomplète. Un renforcement des travaux dans ce domaine permettrait de mieux considérer les facteurs de risque d'acquisition d'une toxoplasmose ou d'une toxoplasmose potentiellement sévère.

Ainsi, le CNR de la Toxoplasmose a pour objectif général de répondre aux besoins exprimés par les gestionnaires de santé et les professionnels en termes d'épidémiologie et de diagnostic de la toxoplasmose sous toutes ses formes (notamment en proposant une standardisation des techniques), mais aussi de soutien aux études portant sur le traitement et la prévention de la toxoplasmose congénitale et de la toxoplasmose chez l'immunodéprimé.

B. 2 Motivation du candidat pour demeurer CNR

Le Centre National de Référence de la Toxoplasmose a été nommé en janvier 2006 en réponse à l'appel d'offre lancé par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) relatif à la création de nouveaux centres de référence, notamment dédié à cette pathologie en particulier. Les principaux objectifs sont une meilleure connaissance épidémiologique de cette maladie en France, une contribution à l'alerte et une évaluation des pratiques de diagnostic pour tendre à une meilleure standardisation de la prise en charge des patients.

Ce CNR s'est constitué sur la base d'un réseau national de laboratoires de parasitologie de CHU (32 laboratoires en 2006, 34 pour le prochain mandat) compétents pour le diagnostic de cette affection. Un Laboratoire Coordonnateur assistés de trois Laboratoires Associés, reconnus pour leurs activités d'expertise, structurent ce réseau. Les Laboratoires membres du réseau travaillent tous en collaboration et émettent des avis en collégialité ou participent à des travaux d'expertise (notamment dans le domaine du diagnostic sérologique et par biologie moléculaire) visant à une standardisation des méthodes et des pratiques, sous la direction des Laboratoires Associés Pôle Sérologie et Biologie Moléculaire.

Le Laboratoire Coordonnateur a en charge le recueil de données épidémiologiques sur la toxoplasmose en participant à diverses enquêtes et à l'analyse des toxoplasmoses congénitales en France (analyse continue depuis 2007 par le système de notification des cas de toxoplasmoses congénitales). En outre, il s'implique dans les enquêtes épidémiologiques animales en collaboration avec le Laboratoire National de Référence de l'ANSES permettant une meilleure compréhension de la circulation du parasite dans l'environnement et en tant que source de contamination humaine.

La structuration en réseau permet une richesse dans l'expertise de part la diversité des méthodes employées dans les différents laboratoires experts, assurant une bonne compétence pour l'évaluation des procédures diagnostiques. Cette collaboration en réseau permet un recueil des souches de toxoplasmes isolées des patients (en particulier, chez les femmes enceintes, les nouveau-nés atteints de toxoplasmose congénitale, les patients immunodéprimés ou les immunocompétents présentant une forme symptomatique). La compétence reconnue du Laboratoire Associé Pôle Souches en matière de génotypage permet d'assurer une actualisation de l'épidémiologie de la toxoplasmose en France (métropole et DOM). La collaboration avec le Laboratoire Coordonnateur (responsable du Pôle Epidémiologie) est étroite puisque ces deux Laboratoires ont créé en partenariat depuis 2002, un Centre de Ressources Biologiques dédié au Toxoplasme (CRB Toxoplasma) intégrant les souches adressées par les laboratoires du réseau du CNR et élargi à d'autres partenaires. Ce CRB qui a une valeur patrimoniale vise à la conservation dans de bonnes conditions (CRB Toxoplasma certifié selon la norme NF S 96900 depuis janvier 2010) des souches humaines et animales collectées de diverses zones géographiques ainsi qu'à leur mise à disposition pour la communauté scientifique désireuse de travailler dans le domaine de la toxoplasmose.

La volonté de poursuivre les travaux initiés lors du premier mandat (voir Bilan scientifique, section D) et de poursuivre leur participation aux enquêtes épidémiologiques et à l'alerte le cas échéant, anime le Laboratoire Coordonnateur et les Laboratoires Associés désireux de continuer à fédérer tous les laboratoires membres de ce CNR. Des objectifs supplémentaires sont fixés pour le prochain mandat par le Laboratoire Coordonnateur et les Laboratoires Associés pour renforcer les connaissances épidémiologiques et standardiser les pratiques de diagnostic avec le souci d'informations des professionnels de santé pour une meilleure prise en charge des patients (voir Objectifs, section H). La collégialité observée dans ce CNR est renforcée par des rencontres régulières au sein des groupes de travail dans les Pôles d'activité et par une réunion annuelle spécifique au CNR permettant une présentation du bilan de l'année écoulée et la fixation des objectifs de l'année suivante. Une forte adhésion des laboratoires, membres du CNR lors de la précédente mandature, à ce renouvellement pour la période 2012-2016, a été observée avec intégration de nouveaux laboratoires et /ou de nouveaux participants au réseau du CNR, témoignant ainsi de la vitalité de ce CNR.

C. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

C.1 Organisation proposée pour répondre aux exigences fixées dans le cahier des charges.

C-1.1 Organisation générale (Liste de laboratoires du réseau national, Annexe 1).

Le CNR Toxoplasmose fonctionne en réseau, en s'appuyant sur les laboratoires déjà fortement impliqués dans le diagnostic, l'épidémiologie, le traitement de la toxoplasmose et reconnus pour leur domaine d'excellence dans la toxoplasmose. Un Laboratoire Coordonnateur et des Laboratoires Associés (reconnus pour leur mission d'expertise dans un domaine d'activité ciblée) assistés par un groupe de travail (Laboratoires Supports) sont inclus dans cette organisation. L'ensemble des Laboratoires impliqués dans ce CNR ont proposé la structuration suivante dès 2006:

Un Laboratoire Coordonnateur (CHU Reims), travaillant en lien étroit avec l'InVS

I. Villena, Responsable de la Coordination du CNR et Responsable du Pôle Epidémiologie

Trois Laboratoires Associés, responsables d'un pôle d'activités, avec un responsable par pôle :

ML. Dardé, Responsable du Pôle Souches : Epidémiologie moléculaire et Chimiosensibilité (CHU Limoges).

E. Candolfi, Responsable du Pôle Sérologie (CHU Strasbourg).

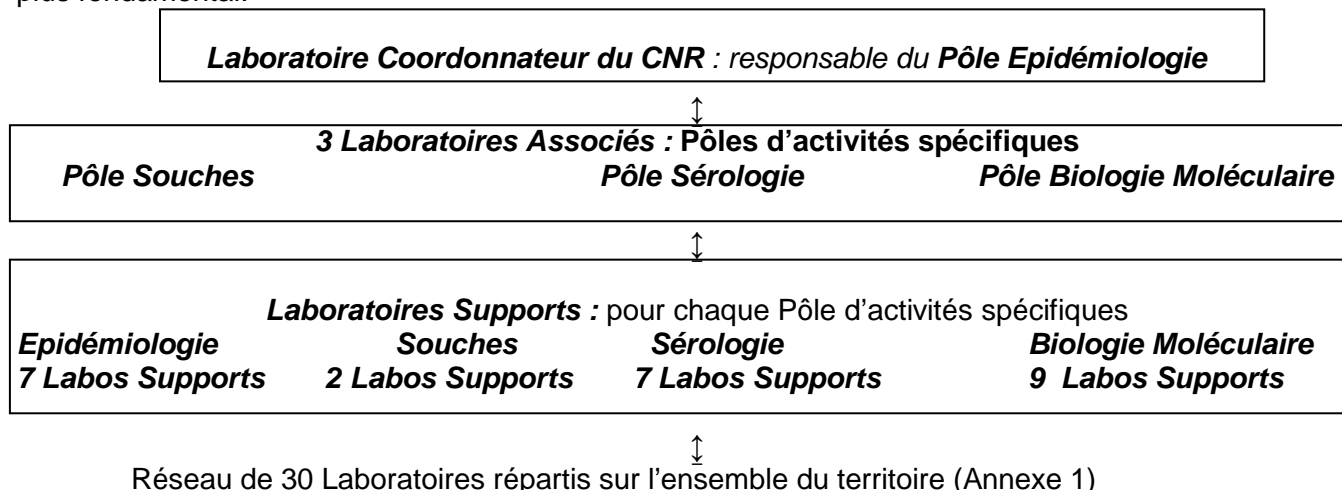
P. Bastien, Responsable du Pôle Biologie Moléculaire (CHU Montpellier).

Des Laboratoires Supports (n= 16) constituant des groupes de travail au sein de chaque pôle. Les groupes de travail apportent un soutien au Laboratoire Associé ; ils sont coordonnés par les Responsables des pôles auxquels ils sont rattachés.

Des Laboratoires Réseau Supports (n= 30), constitués par l'ensemble des laboratoires qui ont manifesté leur souhait de participer aux activités du CNR, ils sont notamment en première ligne pour la mission d'alerte sur l'apparition de cas groupés. Ces laboratoires de CHU constituent un maillage national des laboratoires ayant en charge le diagnostic des toxoplasmoses. Ils fournissent des informations d'ordre épidémiologique, envoient les souches isolées de patients, mettent à disposition leur sérothèque, peuvent participer à diverses études visant à une standardisation de techniques. Ces laboratoires sont, à un échelon local, référents pour les laboratoires hospitaliers et privés dont ils sont un interlocuteur constant.

C-1.2 Modalités de fonctionnement

Le Laboratoire Coordonnateur travaille en lien étroit avec l'InVS (V. Goulet du DMI), il est chargé de collecter les informations de la part des Laboratoires Associés et d'organiser des réunions entre les différents membres, il s'implique activement dans la rédaction des rapports d'études et d'activités annuels. Une réunion annuelle a lieu, réunissant l'ensemble des membres du CNR, permettant la présentation des travaux réalisés au cours de l'année et fixant les objectifs de l'année suivante, cette réunion permet un échange direct et la validation des décisions proposées par les Pôles d'activités. Les Laboratoires Associés assistés des Laboratoires Supports, répondent aux diverses missions énoncées et apportent des données actualisées sur le plan épidémiologique, diagnostique et d'un point de vue plus fondamental.



C-1.3 Les missions définies dans le cahier des charges spécifiques du CNR de la Toxoplasmose

Elles seront remplies par les différents laboratoires constitutifs du CNR : le Laboratoire Coordonnateur en charge du Pôle Epidémiologie assisté des trois Laboratoires Associés choisis pour leur compétence: Le Laboratoire Associé du Pôle Souches est reconnu au niveau international pour le développement des outils de génotypage performants pour l'identification et la caractérisation des souches de *T. gondii*. Le Laboratoire Associé Pôle Sérologie est reconnu pour ses travaux en immunologie tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée et pour son implication dans les tests de réactifs de diagnostic pour cette affection.

Le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire est reconnu pour ses travaux en Biologie Moléculaire et notamment pour avoir mis en place le contrôle national de qualité en biologie moléculaire pour la toxoplasmose (initialement sous l'égide de l'Association des Enseignant en Parasitologie, ANOFEL).

1. Apporter une expertise parasitologique :

- **contribuer au développement, à l'évaluation et à la standardisation de techniques diagnostiques notamment moléculaires** : mission du Laboratoire Associé Biologie Moléculaire. Par sa compétence reconnue en biologie moléculaire, ce Pôle poursuit son travail entamé lors du dernier mandant visant à améliorer globalement les performances du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en France, d'une part en prénatal d'autre part chez l'immunodéprimé, en particulier au moyen d'études comparatives des pratiques, des techniques et des méthodologies au sein des Laboratoires Supports. Il est en charge du contrôle national de qualité en biologie moléculaire en le préparant et le distribuant à tous les laboratoires membres du CNR.

Bastien P., Jumas-Bilak E., Varlet-Marie E., Marty P. for the ANOFEL Toxoplasma-PCR Quality Control Group. Three years of multi-laboratory external quality control for the molecular detection of Toxoplasma gondii in amniotic fluid in France. Clin. Microbiol. Infect., 2007, 13: 430–3.

Sterkers Y., Varlet-Marie E., Cassaing S., Brenier-Pinchart MP., Brun S., Dalle F., Delhaes L., Filisetti D., Pelloux H., Yera Y., Bastien P. Multicentric comparative proficiency study for the molecular detection of low amounts of Toxoplasma gondii using different PCR methods. J Clin Microbiol., 2010, 48 : 3216-22

- **contribuer à l'évaluation et à la standardisation des techniques immunologiques** permettant un diagnostic précoce de l'infection dans le cadre du diagnostic de toxoplasmose congénitale et
- **élaborer pour les biologistes des guides méthodologiques pour la séro-immunologie de la toxoplasmose, accompagnés de recommandations pour l'interprétation des résultats** : ces deux missions sont remplies par le Laboratoire Associé Sérologie. Par sa compétence reconnue dans l'expertise immunologique, ce Pôle (avec ses Laboratoires Supports) apporte des expertises multicentriques indépendantes ou sur la sollicitation de promoteurs industriels, destinées à l'évaluation d'outils de diagnostic sérologique industriels ou pilotes issus de la R et D industrielle ou académique. Ce Laboratoire a en charge la notification des problèmes sérologiques observés en temps réel en collaboration étroite avec le système de réactovigilance de l'AFSSAPS. Il gère la bibliothèque du CNR constituée de sérums spécifiques permettant de réaliser les évaluations des réactifs. La bibliothèque sera accessible sur demande motivée à tous les membres du groupe et aux industriels. Par ailleurs, le Laboratoire Associé apporte des conseils aux laboratoires de biologie médicale (LBM) du public ou du privé dans le cadre du choix des techniques à mettre en œuvre en fonction de leur besoin. De plus, les laboratoires du réseau se fixeront l'objectif d'une charte d'expertise des sérums à problème en identifiant les techniques permettant de résoudre chaque problème de façon spécifique. Sur la base du guide d'interprétation élaboré dans le cadre du contrat précédent (publié et disponible sur le site Internet du CNR) il sera envisagé de créer un logiciel expert d'interprétation.

Villard O., Jung-Etienne J., Cimon B., Franck J., H. Fricker-Hidalgo, Godineau N., Houze S., Paris L., Pelloux H., Villena I., Candolfi E. et le réseau du Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : Conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. Feuilles de Biologie, 2011,208, 43-49.

- **collaborer avec des laboratoires experts en santé animale afin de pouvoir comparer les souches humaines et animales** : mission du Pôle Epidémiologie et du Pôle Souches. Le Laboratoire Coordonnateur collabore activement avec l'ANSES, via le LNR « parasites transmis par les aliments » pour établir et réaliser les plans de surveillance des aliments susceptibles d'être sources de contamination humaine, validés par la DGAL en accord avec l'InVS et l'ANSES. Le Laboratoire Coordonnateur est rattaché sous la forme d'une Unité Sous Contrat (USC Epitoxo) avec

un Laboratoire de l'ANSES (LERPAZ, Pr Boireau) depuis décembre 2010, lui permettant de continuer à assurer une surveillance des principales denrées alimentaires sources de contamination humaine en France (viandes ovines, bovines mais aussi de cheval). Les plans de surveillance ou de contrôle conduisent à l'isolement de souches de toxoplasmes qui sont analysées d'un point de vue génomique par le Laboratoire Associé Souches permettant ainsi une comparaison entre souches humaines et animales.

- **évaluer la sensibilité des souches de *T. gondii* aux anti-infectieux** : mission du Pôle Souches. Ce Pôle contribue à cette évaluation par le développement de techniques d'étude de chimiosensibilité, celles-ci ont été développées initialement par un Laboratoire Support (F. Derouin, Paris Saint Louis) et sont reprises actuellement par le Laboratoire Coordonnateur membre également du Pôle Souches (D. Aubert).

2. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire :

- **par la coordination d'un réseau de surveillance des toxoplasmoses congénitales** basé sur un réseau de laboratoires : cette mission est assurée par le Laboratoire Coordonnateur. Ce laboratoire a organisé en collaboration étroite avec l'InVS la mise en place d'un système national de déclaration des cas de toxoplasmose congénitale basé sur la notification des cas diagnostiqués par les laboratoires du réseau « Toxosurv » en France (y compris les DOM) (Annexe 2). Un comité de pilotage a été constitué en 2006 par l'InVS regroupant des membres du Pôle Epidémiologie du CNR (I. Villena, T. Ancelle, P. Thulliez), des épidémiologistes de l'InVS, un médecin parasitologue hors CNR (Lyon), un gynécologue-obstétricien, un pédiatre, un ophtalmologue et un médecin épidémiologiste en Santé Publique. Ce comité a validé le logiciel spécifique de notification (Toxosurv, Voozanol, EpiconceptTM) développé par le Laboratoire Coordonnateur avec la Société Epiconcept et l'InVS ainsi que le programme statistique produit spécifiquement pour l'analyse des résultats (programme réalisé par T. Ancelle, I. Villena, C. Delmas, sous STATA. Ritme Informatique). Le Laboratoire Coordonnateur fournit tous les ans à l'InVS un rapport synthétique sur les cas notifiés au cours de l'année N-1 (Annexe 3), ce rapport est présenté (de manière détaillée) à l'ensemble des membres du réseau du CNR au cours de la réunion annuelle du réseau et il est diffusé à l'ensemble des Laboratoires du réseau « Toxosurv ». Une extraction du rapport (mentionnant des données minimales choisies avec l'InVS) est disponible sur le site Internet du CNR (Annexe 4).

King L., Villena I., Ancelle T., Wallon M., Garcia P., Thulliez P., Goulet V. La toxoplasmose congénitale : mise en place d'un dispositif de surveillance en France. BEH, numéro thématique 8 avril 2008, 122-24.

Villena I., Ancelle T., Delmas C., Garcia P., Brézin AP., Thulliez P., Wallon M., King L., Goulet V. Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis. Congenital Toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. EuroSurveillance, 2010, 15, 14-19.

- **par la participation à des études épidémiologiques pour actualiser les données épidémiologiques de la toxoplasmose en France** : mission assurée par le Laboratoire Coordonnateur qui contribue aux études en mettant à disposition les techniques biologiques nécessaires à la conduite d'enquêtes élaborées par l'InVS. Ainsi, ce laboratoire peut exécuter ou mandater un ou plusieurs Laboratoires Supports pour réaliser des enquêtes sérologiques de prévalence sur des populations ciblées au cours d'enquêtes conduites par l'InVS pour d'autres pathologies et possiblement en lien avec d'autres CNR qui hébergeraient les sérothèques prélevées à l'occasion de ces enquêtes. Par ailleurs, le réseau des laboratoires partenaires du CNR permet d'établir un relevé des souches du parasite circulant en France, le Pôle Souches ayant en charge de génotyper ces souches pour compléter les données épidémiologiques relatives à la toxoplasmose. Un questionnaire relatif aux sources de contamination sera élaboré par le Laboratoire du Pôle Souches et le Laboratoire du Pôle Epidémiologie pour compléter l'enquête épidémiologiques sur les souches isolées.
- **contribuer à l'investigation des cas groupés** : mission assurée par le Laboratoire Coordonnateur qui met à disposition ses moyens logistiques et les techniques biologiques nécessaires à l'investigation sur demande des Cire ou de l'InVS. Le Laboratoire Coordonnateur peut mandater un ou plusieurs Laboratoires Supports pour participer à cette investigation. Le Laboratoire Coordonnateur s'implique dans la rédaction du rapport en lien avec les Cire concernées et l'InVS. Le Pôle Souches participe également à ces investigations grâce à la mise au point d'un outil de typage particulièrement discriminant permettant d'établir des liens entre les souches isolées des patients et de leur source de contamination.

Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe F, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along Maroni River: epidemiological, clinical and parasitological aspects. Clinical Infectious Diseases 2007 ; 45 : e88-95.

3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire tout événement inhabituel : modification de souches, apparition de résistance, survenue de cas groupés, etc.

Le Laboratoire Coordonnateur est chargé de recueillir de la part des laboratoires partenaires du réseau tout signalement de cas groupés ou TIAC, qu'il répercutera à l'InVS. Ces laboratoires contribueront à l'enquête épidémiologique (au besoin en contrôlant des sérums ou des analyses sur liquides biologiques) avec les CIRE concernées. La détection de souches inhabituelles en France (virulence particulière, génotypes atypiques ou nouveaux) sera signalée à l'InVS par le Pôle Souches qui pourra lancer en lien avec l'InVS et le Pôle Epidémiologie une enquête épidémiologique à la recherche de la source de contamination.

4. Conseil :

- **contribuer à l'élaboration de recommandations** pour la prévention de la transmission de la toxoplasmose au cours de la grossesse : Le Laboratoire Coordonnateur assisté des Laboratoires Associés et de l'ensemble des membres du CNR contribuera à la diffusion (notamment via le site internet) des recommandations élaborées dans le cadre du rapport AFSSA (2005) et reprises dans le cadre d'un rapport de l'HAS (2009), rapports auxquels certains membres du CNR de la Toxoplasmose ont participé. Les recommandations pourront être revues dans leur formulation et présentation par le CNR et proposées aux professionnels et à l'InVS.

Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation – Rapport du groupe de travail « Toxoplasma gondii » de l'Afssa, décembre 2005.

Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse. Rapport et Synthèse de l'HAS, octobre 2009.

- **apporter une aide aux professionnels de santé** pour le diagnostic et la prise en charge de la toxoplasmose chez les femmes enceintes, les nouveau-nés et les immunodéprimés : Le Laboratoire Coordonnateur assisté des Laboratoires Associés et de l'ensemble des membres du CNR apporteront une aide aux professionnels de santé à travers la rédaction de guide d'interprétation des analyses biologiques et de proposition de prise en charge en consensus avec les professionnels médicaux. Le CNR proposera une formation aux professionnels de santé par création d'un site d'autoformation par l'analyse de dossiers biocliniques virtuels ; cette formation sera complémentaire des indispensables formations continues régionales effectuées par chaque membre du réseau directement auprès des LBM. Pour la prise en charge médicale de la toxoplasmose chez les femmes enceintes, un Programme Hospitalier de Recherche Clinique national (PHRC) visant à l'évaluation de la prescription de spiramycine ou de pyriméthamine–adiazine® lors de séroconversions pergestationnelles en vue de la réduction de la transmission parasitaire au fœtus, a été mis en place en 2010 sur recommandation de l'HAS (rapport 2009). Pour la prise en charge médicale de la toxoplasmose chez les nouveau-nés, un PHRC national visant à l'évaluation de la durée du traitement postnatal (3 mois versus 12 mois) par pyriméthamine –sulfadoxine (Fansidar®) a débuté en 2010 afin de revoir les schémas thérapeutiques actuellement proposés. L'évaluation optimale de la durée du traitement sera faite sur l'apparition de séquelles (principalement ophtalmologiques) et sur l'impact du traitement sur la qualité de vie des enfants et parents. Pour ces deux PHRC, I. Villena s'est impliquée en tant que co-investigateur faisant partie du comité de pilotage de chacun de ces PHRC, prenant en charge la coordination des laboratoires de parasitologie impliqués dans ces programmes. Il est important de noter que la majorité des laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose participent à ces PHRC en association avec les services médicaux (Gynécologie-Obstétrique et Pédiatrie) de leur CHU directement impliqués.
- **contribuer à l'évaluation du programme national** de dépistage sérologique systématique chez la femme enceinte : le Pôle Epidémiologie en charge de la surveillance des toxoplasmoses congénitales sera amené en lien avec les Laboratoires Supports et l'ensemble des laboratoires du CNR à fournir une évaluation des pratiques diagnostiques dans le diagnostic des toxoplasmoses congénitales (à partir de la base du recueil cas de toxoplasmoses congénitales par l'analyse des pratiques et des performances des méthodes diagnostiques). Il pourra participer à l'évaluation du

programme national de dépistage en analysant au cours du temps les tendances décrites dans la notification des cas de toxoplasmoses congénitales. Il pourra également participer à l'élaboration d'un nouveau programme ou schémas de surveillance en lien avec les autorités compétentes (HAS, et InVS), notamment après obtention des résultats du PHRC visant à l'évaluation de la prescription de spiramycine ou de pyriméthamine –adiazine® lors de séroconversions pergestationnelles en vue de la réduction de la transmission parasitaire au fœtus. Si de nouvelles mesures de prévention ou nouveaux programmes sont proposés à l'issue de ce PHRC, le CNR contribuera à l'évaluation de l'impact de ces nouvelles mesures, notamment par la continuité du recueil du nombre de toxoplasmoses congénitales observés annuellement.

C. Moyens dont dispose le Laboratoire Coordonnateur et les Laboratoires Associés

C-1 En matière de ressources humaines

Le CNR de la Toxoplasmose est un CNR fonctionnant en réseau impliquant 34 laboratoires de CHU participant activement dans les missions du CNR. Ces laboratoires sont fédérés par un Laboratoire Coordonnateur candidat au renouvellement du CNR et par 3 Laboratoires Associés qui fonctionnent avec un groupe de travail (Laboratoires Supports).

1- Organigramme du CNR du Laboratoire Coordonnateur

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance (organisme payeur)	Temps consacré (ETP)
Isabelle VILLENA	PU-PH,	CHU /Université Reims	0 ,25
Dominique AUBERT	MCU-PH	CHU /Université Reims	0
Cathy CHEMLA	PH	CHU Reims	0,05
Laurence DUBOIS	Secrétaire	CHU Reims	0,20
Naïma ORTIS	Technicienne	CHU Reims	0,10
Régine GEERS	Technicienne	CHU Reims	0,05
Christelle DELMAS	ARC	CHU Reims/ InVS	0,40
Laboratoires Support			
Marie-Laure DARDÉ	PU-PH	Université Limoges/CHU	0,05
Thierry ANCELLE	MCU-PH	Université Paris 5 /Cochin	0,10
Francine PRATLONG	MCU-PH	Université Montpellier/CHU	0,10
Pierre MARTY	PU-PH	Université Nice/CHU	0,10
Nicole FERRET	PH	CHU Nice	0,05
Loïc FAVENNEC	PU-PH	Chu Rouen	0,05
Judith FILLAUX	MCU-PH	Université Toulouse/CHU	0,10
Bernard CARME	PU-PH	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,10
Stéphane SIMON	Technicien	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,05

Soit au total : 1,75 ETP

Biologistes :	PU-PH	0,55	ETP
	MCU-PH	0,30	ETP
	PH	0,10	ETP
Attaché Recherche Clinique :		0,40	ETP
Techniciens :		0,20	ETP
Secrétariat :		0,20	ETP

Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie: rôles, moyens humains.

Rôles de chacun des Laboratoires Supports

Le Pôle Epidémiologie fonctionnera avec la participation de Laboratoires Supports ayant une expérience en épidémiologie de la toxoplasmose. Chacun des participants au sein de ce pôle travaillera en collaboration pour élaborer les fiches de renseignements épidémiologiques et participer à l'élaboration

d'enquêtes en lien avec les laboratoires du réseau répartis sur le territoire. Chacun des laboratoires supports contribue à l'étude épidémiologique de la toxoplasmose en France en participant au réseau CRB et en adressant les souches de toxoplasmes isolées de patients et en collectant les informations épidémiologiques afférentes à ces souches.

Le Laboratoire de Cochin, GHU Cochin-Paris Ouest s'impliquera dans ce pôle avec la participation de T. Ancelle détaché plusieurs années auprès de l'InVS pour lequel il a participé en collaboration avec le RNSP à de nombreuses enquêtes épidémiologiques listées ci-après.

Le Laboratoire de Limoges (Laboratoire Associé au CNR, responsable du Pôle Souches) sera impliqué dans le recueil de données épidémiologiques afférentes aux souches toxoplasmiques humaines et animales isolées.

Les Laboratoires (CHU) de Montpellier, Nice, Rouen et Toulouse sont fortement impliqués dans le suivi de toxoplasmoses (en particulier congénitales ou chez les immunodéprimés). Ils sont reconnus au niveau régional pour leur mission d'expertise et de conseils et ont également participé à diverses études européennes.

Le laboratoire de Cayenne (CH et faculté de Médecine Antilles Guyane) étudie l'épidémiologie des Parasitoses Tropicales en Guyane et aux Antilles Françaises dans une approche clinique et biologique.

Ressources humaines des Laboratoires Supports affectées aux activités du CNR :

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, GHU Cochin-Paris Ouest.

Correspondant impliqué : T.ANCELLE (MCU-PH)

- Etude INSERM (1983) sur la séroprévalence de la toxoplasmose en Guadeloupe : plan de sondage, réalisation de l'étude sur le terrain, analyse des données.
- Membre du groupe d'experts (1994-1995) RNSP/DGS sur la révision de la politique de surveillance des maladies infectieuses, zoonoses et maladies d'importation.
- Réalisation d'une étude nationale (1995) de prévalence à la demande du RNSP (actuel InVS) faisant suite à une démarche initiative du Laboratoire de Parasitologie- Mycologie du CHU d'Amiens (B. Carne). Avec ce dernier, le principe d'utiliser l'échantillon de l'enquête nationale périnatale de l'INSERM (13 500 parturientes) et de demander l'intégration de données concernant la toxoplasmose (statut sérologique, séroconversion éventuelle, traitements) a été conçu. T. Ancelle a réalisé en collaboration avec le RNSP (V. Goulet), l'analyse des données en termes de séroprévalence et d'incidence. L'intégration de données sur la toxoplasmose a été reconduite lors de l'enquête nationale périnatale de 2003 et 2010.
- Réalisation d'une enquête (1995) cas-témoins sur les facteurs d'acquisition de la toxoplasmose chez les femmes enceintes, à la demande du RNSP et réalisée en collaboration avec l'Institut de Puériculture de Paris (P. Thulliez). Montage du protocole, recueil des données, analyse en collaboration avec le RNSP (V. Goulet).
- Membre du comité de pilotage scientifique InVS (2000-2001) « Priorisation des zoonoses non alimentaires ». Ce groupe de travail a fait le constat de la nécessité de mettre en place des moyens afin d'évaluer le programme de dépistage et d'estimer le nombre de séroconversions et de fœtus contaminés.
- Membre du comité de pilotage scientifique AFSSA/ InVS (2000-2003) « Morbidité et la mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France ». A ce titre, le rôle de la toxoplasmose dans ces pathologies a été pris en compte..
- Responsable du département Formations-Documentation et membre du comité de direction de l'InVS (2002-2004), il a participé à plusieurs commissions d'évaluation de CNR.
- Depuis 2002, membre du comité de rédaction du Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.
- Membre actif du Pôle Epidémiologie de la précédente mandature du CNR depuis 2006 avec participation aux deux investigations des cas groupés de Montpellier (2009) et de la TIAC en Aveyron (2010).
- Création de la première version sous STATA de l'application d'analyse des données de la base du système de surveillance Toxosurv.
- Membre du comité de pilotage « Toxosurv » à l'InVS avec I. Villena et C. Delmas.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (EA3174), CHU de Limoges (Laboratoire Associé au CNR, Pôle Souches)

Correspondant impliqué : ML. DARDE (PU-PH)

L'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Limoges a été la première à démontrer le polymorphisme des souches de *Toxoplasma gondii* et à décrire les 3 principaux types, puis à développer les techniques d'analyse par microsatellites permettant la détection des isolats atypiques et recombinants. Elle développe des études de séroprévalence animale et des méthodes de détection dans l'environnement qui peuvent contribuer à la connaissance de l'épidémiologie du parasite. Ces données peuvent contribuer à l'élaboration des recommandations pour la prévention de la toxoplasmose.

- Praticien habilitéée par arrêté ministériel à pratiquer les examens biologiques en vue du diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale.

**Laboratoire de Parasitologie-Mycologie UMR MIVEGEC (CNRS 5290- IRD 224-Université Montpellier 1),
CHU de Montpellier**

Correspondant impliqué : F. PRATLONG (MCU-PH)

F. Pratlong est en charge, depuis plus de 30 ans, du diagnostic biologique de la toxoplasmose. Elle a initié et participe à des réunions biocliniques avec les médecins en charge des femmes enceintes présentant une séroconversion en cours de grossesse, des enfants atteints de toxoplasmose congénitale ou des patients immunodéprimés. Praticien habilitéée par arrêté ministériel à pratiquer les examens biologiques en vue du diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale, à ce titre elle fait partie du Centre pluridisciplinaire de diagnostic anténatal du CHRU de Montpellier. De part les expertises sérologiques réalisées et les conseils quotidiens qu'elle prodigue aux cliniciens, sages-femmes et biologistes, le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie constitue un pôle de référence pour la région Languedoc-Roussillon. Elle est par ailleurs fortement impliquée dans le CNR des *Leishmania* en place depuis 1998, elle est le curateur de la cryobanque internationale de *Leishmania* qui possède près de 6000 souches; à ce titre elle peut apporter de nombreux conseils dans le fonctionnement d'un CNR.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Inserm U 895), CHU de Nice

Correspondants impliqués : P. MARTY (PU-PH) et N. FERRET (Praticien Attaché)

P. Marty participe à la surveillance des femmes enceintes dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose. A ce titre, il a une consultation régulière dans le cadre de la toxoplasmose et représente une référence à un niveau régional en matière de diagnostic de la toxoplasmose (toxoplasmoses acquises, congénitales ou de l'immunodéprimé). Il a en outre participé à de nombreuses études européennes portant sur l'évaluation des méthodes pour le diagnostic de la toxoplasmose et la surveillance des enfants atteints. Il s'intéresse particulièrement aux modes de contamination des femmes enceintes et a récemment mis en évidence que la viande de cheval était un aliment contaminateur potentiel. Il est aussi engagé dans des démarches de formation auprès des personnels au contact des femmes enceintes.

- Praticien habilité par arrêté ministériel à pratiquer les examens biologiques en vue du diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale.

- Expert auprès de firmes internationales dans le domaine du diagnostic de la toxoplasmose.

N.Ferret, pédiatre suit en consultation au sein du Laboratoire, tous les enfants atteints de toxoplasmose congénitale diagnostiqués dans la région de Nice. Elle participe à des études européennes dans le domaine de la toxoplasmose congénitale. Elle est aussi formatrice auprès des personnels de santé.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (rattachement EA 3800 Reims) CHU de Rouen

Correspondant impliqué : L. FAVENNEC (PU-PH)

L. Favennec est en charge, depuis plus de 15 ans, du diagnostic biologique de la toxoplasmose. Il participe à des réunions biocliniques avec les médecins en charge des femmes enceintes présentant une séroconversion en cours de grossesse, des enfants atteints de toxoplasmose congénitale ou des patients immunodéprimés. En outre, de part les expertises sérologiques réalisées et le dialogue actif développé avec les cliniciens, le Laboratoire de Parasitologie constitue un laboratoire de référence pour la région Haute Normandie. Enfin, dans le cadre de son activité de recherche concernant les protozoaires parasites de l'homme contaminant les ressources en eau, le laboratoire participe actuellement à plusieurs projets de recherche (ANR, Anses) en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie du CHU de Reims, Coordonnateur du CNR (I. Villena, D. Aubert) ayant pour but d'étudier la contamination alimentaire (végétaux, eau) par différents protozoaires et en particulier *Toxoplasma gondii*.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (UMR152), CHU de Toulouse

Correspondant impliqué : J. FILLAUX (MCU-PH)

J. Fillaux remplacera MH Bessières dans le CNR de la Toxoplasmose et en tant que Laboratoire Support dans le Pôle Epidémiologie, cette dernière étant partie à la retraite fin 2010. J. Fillaux travaillait en collaboration avec Mme Bessières depuis novembre 2006 dans le domaine de la toxoplasmose, en termes de responsabilité du secteur immunodiagnostic, de productions pédagogiques et scientifiques, d'encadrement méthodologique et épidémiologique de thèse d'exercice portant sur la toxoplasmose. J. Fillaux est titulaire d'un DES de Santé Publique et Médecine sociale, axé sur l'épidémiologie et la recherche clinique, et d'un DESC de Pathologies Infectieuses et Tropicales, Clinique et Biologique.

- Investigateur associé pour les PHRC Toxogest et Toscane

- Praticien habilitéée par arrêté ministériel à pratiquer les examens biologiques en vue du diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale.
- Expert auprès de firmes internationales dans le domaine du diagnostic de la toxoplasmose.

Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie (LHUPM) et Centre d'Investigation Clinique Epidémiologie Clinique (CIC-EC) Antilles Guyane (CIE 802 Inserm) Centre Hospitalier de Cayenne, EA 3593, Université Antilles Guyane.

Correspondant impliqué : Bernard CARME (PU-PH), directeur des 3 structures LHUPM, EA3593 et CIC-EC

Le laboratoire de Cayenne a permis par ses travaux sur la toxoplasmose de mettre en évidence les aspects cliniques inhabituels de la toxoplasmose en Guyane et l'épidémiologie en rapport avec un cycle sylvestre sauvage de ce qui est désormais connu sous l'appellation de la toxoplasmose amazonienne. Il existe une étroite collaboration avec l'équipe de Parasitologie de Limoges pour l'isolement et la caractérisation des souches responsables chez les patients et dans le réservoir de parasites animal sauvage et domestique. Des études épidémiologiques complémentaires sont en cours dont l'objectif est de préciser la dynamique de ce cycle au sein des félidés sauvages et de leurs proies. Il étudie par ailleurs l'exposition et les facteurs de risque de survenue des primo-infections toxoplasmiques au sein des communautés de Guyane aux multiples origines.

B. Carme avait été l'initiateur au milieu des années 90, après une étude réalisée à Amiens, de l'actualisation des données sur le niveau d'immunisation vis à vis de la toxoplasmose et les risques de séroconversions des femmes enceintes en France métropolitaine. Les démarches entreprises en 1994 auprès du RNSP (V. Goulet) ont abouti à l'intégration de la toxoplasmose dans l'enquête nationale périnatale 1995 de l'INSERM, phénomène qui se répète régulièrement depuis (dernière enquête 2010).

2 - Laboratoire Associé Pôle Souches : Epidémiologie moléculaire et Chimiosensibilité (CHU Limoges)

Pr. M L DARDÉ, Responsable

Organigramme du CNR du Laboratoire Associé Pôle Souches

<i>Nom Prénom</i>	<i>Fonctions</i>	<i>Appartenance (organisme payeur)</i>	<i>Temps consacré (ETP)</i>
Marie-Laure DARDÉ	PU-PH	Université Limoges/CHU	0,10
Daniel AJZENBERG	MCU-PH	Université Limoges/CHU	0,20
Homayoun RIAHI	Technicien	CHU Limoges/InVS	0,50
Jacques DEMOMENT	Animalier	CHU Limoges	0,20
Christine TARRADE	Secrétaire	CHU Limoges	0,05
Laboratoires Supports			
Dominique AUBERT	MCU-PH	CHU /Université Reims	0,10
Emilie DUPUIS	Technicienne	CHU Reims	0,05
Magali DEMAR	Médecin, PH	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,10
Stéphane SIMON	Technicien	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,05

Soit au total : 1,30 ETP

Biologistes :	PU-PH	0,10	ETP
	MCU-PH	0,30	ETP
	PH	0,10	ETP
Techniciens/Animalier :		0,75	ETP
Secrétariat :		0,05	ETP

Ressources humaines des Laboratoires Supports affectées aux activités du CNR :

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (EA3800), CHU de Reims

Correspondant impliqué : Dominique AUBERT (MCU-PH)

L'équipe du laboratoire de Reims est depuis longtemps impliquée dans des études sur la toxoplasmose (labellisation ministérielle sur cette thématique depuis 1982). Elle a initié le projet visant à la constitution d'un CRB Toxoplasmose dont elle est co-responsable et gère la banque de souches de toxoplasmes (co-localisation avec Limoges). Elle a en charge entre autres, le typage des souches collectées sur 3 gènes et assure la multiplication des souches en culture cellulaires. D. Aubert est responsable opérationnel du site de Reims, en charge des développements techniques et notamment sur l'aspect chimiosensibilité depuis l'arrêt du Laboratoire de Paris St Louis. Il s'implique également dans le développement des techniques de biologie moléculaire et dans les thèses effectuées au sein de l'équipe de recherche, toutes centrées sur la toxoplasmose. Il a en outre développé la collecte de souches animales en partenariat avec des organismes en charge de la surveillance vétérinaire (Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Aube, AFSSA, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage) et encadre une thèse dans le cadre de l'Unité sous contrat ANSES de l'équipe (visant au développement de nouvelles techniques de détection de *T. gondii* dans matrice carnée, en particulier chez le mouton, avec estimation du portage parasitaire). Dans le même esprit, il encadre une thèse sur le développement de techniques de détection dans l'environnement et les matrices végétales.

- Praticien habilité par arrêté ministériel à pratiquer les examens biologiques en vue du diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale.

Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie (LHUPM) et Centre d'Investigation Clinique Epidémiologie Clinique (CIC-EC) Antilles Guyane (CIE 802 Inserm) Centre Hospitalier de Cayenne, EA 3593, Université Antilles Guyane.

Correspondant principal impliqué : Magalie DEMAR (PHU)

L'équipe étudie l'épidémiologie des Parasitoses Tropicales en Guyane et aux Antilles Françaises dans une approche clinique et biologique. Concernant la toxoplasmose, elle a mis en évidence les aspects cliniques inhabituels de la toxoplasmose en rapport un cycle sylvestre en Amazonie. M. Demar collabore avec l'équipe de Parasitologie de Limoges pour l'isolement des souches responsables chez les patients et dans le réservoir de parasites animal sauvage et domestique. Elle étudie par ailleurs, avec B. Carme, l'exposition et les facteurs de risque de survenue au sein des communautés de Guyane (en collaboration avec le Pôle Epidémiologie).

3 - Laboratoire Associé Pôle Sérologie (CHU/Université Strasbourg)

Pr E. CANDOLFI, Responsable

Organigramme CNR du Laboratoire Associé Pôle Sérologie

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance	Temps consacré (ETP)
CANDOLFI Ermanno	PU-PH	ULP de Strasbourg	0,10
VILLARD Odile	MCU-PH	ULP de Strasbourg	0,20
FILISSETTI Denis	MCU-PH	ULP de Strasbourg	0,03
LANG Cécile	Ingénieur	ULP de Strasbourg	0,15
BACHMANN Michèle	Secrétaire	ULP de Strasbourg	0,15
LIENHARDT Elisabeth	Technicien	ULP de Strasbourg	0,20
HOFFMANN Estérina	Bibliothécaire	ULP de Strasbourg	0,10

Le Pôle Sérologie fonctionnera avec 5 sites supports correspondant à 7 laboratoires (Angers, Grenoble, Marseille, Paris et Nice) qui permettront une approche consensuelle de la problématique et des besoins. Les sites géographiques et la taille des laboratoires permettront également de créer la sérothèque et d'effectuer les expertises multicentriques indépendantes des réactifs. Certains de ces laboratoires ont publié, y compris ensemble, de nombreux travaux qui sont les garants de la qualité de la réflexion entreprise au sein du groupe de travail.

Membres et suppléants	Fonctions	Appartenance	Temps consacré (ETP)
CIMON Bernard	MCU-PA	Angers	0,10
PELLOUX Hervé /FRICKER HIDALGO Hélène	PU-PH/PH	Grenoble	0,10
FRANCK Jacqueline/ R. PIARROUX	MCU-PH/PU-PH	Marseille	0,10
POMARES Christelle	AHU	Nice	0,10
HOUZE Sandrine	PH	Paris-Bichat	0,10
PARIS Luc	PH	Paris-Pitié Salpêtrière	0,10
GODINEAU Nadine	PH	Paris-Saint-Denis	0,10

Soit au total : 1,60 ETP

Biologistes :	PU-PH	0,20	ETP
	MCU-PH/PA	0,35	ETP
	PH	0,35	ETP
	AHU	0,10	ETP
Ingénieur :		0,15	ETP
Techniciens :		0,20	ETP
Secrétariat :		0,25	ETP

Ressources humaines des Laboratoires Supports affectées aux activités du CNR :

Laboratoire de parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers

Correspondant : B. CIMON (MCU-PA)

Le Laboratoire d'Angers bénéficie d'une expérience de près de 30 ans dans le domaine de la toxoplasmose, tant dans le diagnostic des formes graves chez le patient immunodéprimé que dans la prévention et le diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

Le Laboratoire réalise 6000 à 6500 sérologies/an (6350 en 2009, 6445 en 2010) non seulement pour le compte du CHU d'Angers mais aussi pour de nombreux laboratoires de biologie médicale du secteur public et privé dans le cadre d'expertises sérologiques. Ainsi, plus de 600 expertises sérologiques sont réalisées par an pour une centaine de laboratoires partenaires. Les techniques employées pour le diagnostic sérologique sont : Toxo IgG et IgM AXSYM® (Diagnostics Abbott), Vidas IgG Avidity® (BioMérieux), ISAGA IgM® et ISAGA IgA® (BioMérieux), et Western-blot (LDBio). Le laboratoire, agréé pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose depuis 1997, fait partie du centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal du CHU d'Angers. Il est également associé au Réseau de Santé "Sécurité Naissance-Naître Ensemble" des Pays de la Loire. Au sein du laboratoire, l'ensemble des activités liées à la toxoplasmose est sous la responsabilité du Dr B. Cimon depuis 1988.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble

Correspondants : H PELLOUX (PUPH) et H FRICKER-HIDALGO (PH)

Hervé Pelloux (HP) est docteur en médecine et en sciences, PU-PH, Chef de Service, responsable de groupe au sein de l'UMR CNRS UJF 5163 LAPM. HP a participé à et a un rôle d'expert dans de nombreuses études nationales et internationales sur le diagnostic sérologique ou par biologie moléculaire de la toxoplasmose (collaborations industrielles, projets de recherche clinique, recherche translationnelle). Il a mis au point des réactifs commercialisés internationalement. Ses travaux portent à la fois sur la toxoplasmose congénitale et de l'immunodéprimé, et sur des aspects fondamentaux concernant la physiopathologie de la toxoplasmose. HP est auteur ou co-auteur d'environ 120 publications internationales. Hélène Fricker-Hidalgo (HFH) est praticien hospitalier, auteur ou co-auteur de 40 publications internationales, en charge du secteur toxoplasmose au quotidien et de plusieurs études sur les techniques de diagnostic de la toxoplasmose, congénitale ou chez l'immunodéprimé. HP et HFH sont autorisés à réaliser le diagnostic anténatal biologique de la toxoplasmose.

L'équipe de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble possède une expérience importante et ancienne dans le domaine de la sérologie toxoplasmique. L'activité Toxoplasmose est de 1000000 B/an environ, soit une fourchette de 4500 à 5000 analyses/an, comprenant 5000 sérologies/an, selon les années et les protocoles. Notre recrutement concerne principalement le CHU de Grenoble, les hôpitaux et maternités périphériques du sillon Alpin, mais aussi des laboratoires répartis sur le territoire national. Nous travaillons sur des sera venant principalement d'immunodéprimés (SIDA, greffés) et de couples mère - enfant. Les principales techniques sérologiques utilisées sont : Immunofluorescence, Vidas, Architect, Isaga, Toxocreen, Western-Blot. Nous disposons d'une animalerie dédiée au diagnostic de la toxoplasmose. Notre équipe est relais Abbott depuis de nombreuses années. Les exigences de la démarche qualité et d'accréditation du laboratoire sont appliquées de façon rigoureuse au secteur

toxoplasmose. Le laboratoire effectue de nombreuses expertises tant nationales qu'internationales, pour les problèmes sérologiques de la femme enceinte et de l'enfant, de l'immunodéprimé, ou en cas d'atteinte oculaire. Le laboratoire a en particulier mis au point une technique d'avidité appliquée à un automate (Vidas) commercialisée dans de nombreux pays. Nous participons régulièrement à des expertises avec des sociétés industrielles, pour des études pré-commercialisation et des marquages CE. Le laboratoire, d'une surface de 459m² met à la disposition du groupe le personnel du secteur toxoplasmose selon les besoins des travaux en cours.

HFH et HP sont experts auprès de l'AFSSAPS et de l'HAS, et nous participons à plusieurs groupes d'experts dans le domaine de la toxoplasmose et plus particulièrement de la sérologie (voir publications jointes). Nous sommes membres du CPDPN de Grenoble. HP est membre du conseil scientifique du Centre de Ressources Biologiques national pour la toxoplasmose.

L'expertise de notre laboratoire dans le domaine de la toxoplasmose ne se résume pas à l'aspect sérologique, puisque nous nous investissons en particulier dans des travaux de biologie moléculaire à visée diagnostique, et dans l'étude des mécanismes fondamentaux régulant l'infection toxoplasmique (UMR 5163, contrat d'interface INSERM A Hakimi/H Pelloux). Notre activité et notre visibilité internationales dans le domaine sont attestées par nos publications et nos collaborations, comme par exemple l'European Study Group on Clinical Parasitology de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (HP trésorier membre du board du groupe)

Laboratoire de Parasitologie- Mycologie du CHU de Marseille

Correspondants : J. FRANCK (MCU-PH) et R.PIARROUX (PU-PH)

Jacqueline Franck (JF), expert auprès de l'Agence du médicament de 1995 à 2000 est actuellement expert auprès de l'AFSSAPS. JF a participé à la réévaluation des trousse Toxoplasmose IgG en 1995 pour l'ex agence du médicament et réalise des expertises pour cet organisme et pour des sociétés européennes produisant des réactifs (marquage CE). Dans le cadre de l'European Network on Congenital Toxoplasmosis, JF a participé, en tant qu'expert, à une étude multicentrique européenne sur l'évaluation des méthodes sérologiques applicables au diagnostic de la toxoplasmose congénitale. Le Laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Marseille est laboratoire référent pour le dépistage de la Toxoplasmose congénitale et agréé par le Ministère de la Santé pour le diagnostic prénatal de cette affection (Pr Piarroux - Dr. Franck) depuis 1996. Le laboratoire pratique en moyenne 13 000 sérologies par an : dépistage de la Toxoplasmose congénitale, surveillance des patients immunodéprimés (VIH, transplantés et greffés de moelle). Il assure pour les centres hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales de la région (Bouches du Rhône, Vaucluse, Var) le contrôle des sérologies à problème. Le laboratoire a depuis 1998 établi un Contrat de collaboration scientifique et technique avec la société LDBIO Diagnostics - Lyon pour la production de l'antigène et le contrôle des réactifs Western Blot appliqués au diagnostic de la Toxoplasmose congénitale. L'expérience du laboratoire s'étend à la surveillance de cette affection chez l'immunodéprimé (Raffi et. al, 1999 et Lepout et. al, 2001) et en ophtalmologie (Riss et. al 1995).

Il participe depuis plusieurs années à des expertises nationales et européennes : évaluation du réactif LDBIOTOXO II IgG (2005), Pilot Study ELECSYS Toxo G/M Roche (2005), évaluation des réactifs ELECSYS Toxo G/M Roche (marquage CE) portant sur 3000 sérums (2006), expertise VIDIA TOXO IgG/IgM BioMérieux (2007), élaboration d'une plaquette VVIP-VIDAS VIDIA Informations (Janvier 2007), évaluation de l'automate EasyMAG bioMérieux pour l'extraction d'ADN toxoplasmique sur liquide amniotique (2010), expertise du réactif Avidity IgG Roche (2010).

Le laboratoire est Centre Relais Toxoplasmose bioMérieux depuis février 2010 apportant son expertise aux biologistes travaillant sur VIDAS Toxo G/M et VIDIA G/M ainsi qu'aux cliniciens.

Le laboratoire en tant que Laboratoire Support prend une part active au groupe de travail du Pôle Sérologie du CNR Toxoplasmose (évaluation des réactifs HAI Fumouze, HAI Behring et VIDIA TOXO IgG et IgM (2008-2009) et réalisation de Dye test (2010).

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Pitié – Salpêtrière

Correspondant : Docteur L. PARIS (PH)

Pour le diagnostic de la toxoplasmose le laboratoire a effectué en 2010, 17160 sérologies et 1090 PCR. L'existence d'une animalerie agréée avec des techniciens et praticiens autorisés pour l'expérimentation sur les animaux fait du laboratoire le seul site parisien à prendre en charge les placentas pour recherche du toxoplasme par inoculation à l'animal. Le recrutement comprend trois maternités (Pitié-Salpêtrière, St Antoine et A. Trousseau), un hôpital pédiatrique (A. Trousseau) avec une consultation de toxoplasmose congénitale, une très grosse cohorte de patients infectés par le VIH (plus de 3000 patients à la Pitié-Salpêtrière) ainsi que de nombreux greffés (foie, reins, cœur, moelle...). Depuis novembre 2004 a été reprise l'activité de diagnostic de la toxoplasmose en ophtalmologie avec environ 150 prélèvements de chambre antérieure par an. Outre les techniques commercialisées, nous produisons de l'antigène *T. gondii* pour la réalisation de techniques sérologiques personnelles (IFI IgG et IgM, agglutination sensibilisée, ISAgA IgA).

Supervisant tout le secteur toxoplasmose, le Dr Luc Paris est :

- Expert auprès de l'AFSSAPS dans le domaine de la sécurité sanitaire des dispositifs in vitro (nomination au journal officiel du 10 septembre 2002) et membre du groupe de travail sur la toxoplasmose de l'AFSSAPS depuis janvier 1995.

- Expert auprès du comité scientifique et médical du LNE (organisme notifié pour la marquage CE des dispositifs médicaux).
- Membre du comité scientifique d'Orphanet.
- Membre du CRB toxoplasmose
- Expert pour la Parasitologie à la commission d'appel d'offres de l'AP-HP.

Dans ce cadre le laboratoire a participé à l'évaluation de tous les réactifs Toxoplasmose IgG du marché menée par l'AFSSAPS en 1996 et est site d'évaluation pour des réactifs toxoplasmose IgG ayant dû être évalués ou réévalués depuis cette date. Le laboratoire a également développé des coopérations industrielles pour la mise au point de nouveaux réactifs et/ou automates en particulier avec Roche Diagnostics Allemagne, DiaSorin et Bio-Rad. C'est tout le travail conduit dans le service en particulier par Fériel Touafek qui a permis la mise au point et l'enregistrement de la trousse diagnostique développée par Biorad pour l'avidité ; une version modifiée de cette trousse, permettant une meilleure discrimination, va être commercialisée à la suite de travaux complémentaires faits en 2010. Enfin le laboratoire assure le contrôle des sérologies à problème pour de nombreux laboratoires d'analyses biologiques tant privés que publics (environ 4500 prélèvements par an) ; nous avons un contrat exclusif de relais Roche pour toute la France.

Activité pour le CNR

Au sein du laboratoire trois biologistes travaillent sur la Toxoplasmose, Luc Paris, PH temps plein, Fériel Touafek Praticien attaché temps plein et Oussama Mouri, praticien attaché mi-temps. Chacun consacre au moins 10% de son temps au CNR.

Laboratoire de Parasitologie du CHU Bichat – C. Bernard, 75018 Paris

Correspondant : S. HOUZE (PH)

Le laboratoire effectue environ 7500 sérologies/an de dépistage. Son recrutement vient essentiellement de la maternité de Bichat et le laboratoire est laboratoire expert pour les laboratoires du groupe hospitalier HUPNVS (Hôpitaux Universitaires de Paris Nord Val de Seine) qui comprend les maternités de Beaujon et de Louis Mourier, ainsi que pour le laboratoire de l'hôpital Jean Verdier et sa maternité. Nous assurons également les sérologies pour les patients immunodéprimés des hôpitaux de Bichat et d'Avicenne : patients VIH+, patients greffés, patients sous immunosuppresseur. Un service de néonatalogie sur Bichat permet d'assurer le suivi sur le site des enfants et notamment en cas de séroconversion toxoplasmique. Le service participe au PHRC Toxogest.

Nous avons accès à de nombreuses techniques sérologiques commerciales. Le laboratoire participe à des évaluations de réactifs : VIDIA BioMérieux, LIAISON DiaSorin. Dans le cadre du CNR, le laboratoire a participé à l'évaluation des réactifs.

Unité de Parasitologie-Mycologie du laboratoire de Microbiologie du CHG Delafontaine, 93200 Saint-Denis

Correspondant : N. GODINEAU (PH)

L'Unité de Parasitologie effectue 8700 sérologies/an. Les techniques usuelles employées sont: Toxo IgG et IgM AXSYM® (Abbott), VIDAS IgG® et VIDAS IgG AVIDITY® (Biomerieux), ISAGA IgM® (Biomerieux), TOXO IHA Fumouze®, Western Blott : LDBIO-TOXOII IgG confirmation et Toxoplasma T IgG-IgM. Elles concernent le dépistage et le suivi des femmes enceintes et d'autres patients en particulier des immunodéprimés. De plus, une cohorte annuelle de 70 femmes enceintes HIV -SIDA est suivie à la Maternité de l'Hôpital où sont effectués plus de 3000 accouchements chaque année.

N. Godineau est praticien hospitalier en Parasitologie à Saint-Denis depuis 1988 après avoir été assistante hospitalo-universitaire dans le laboratoire de Parasitologie du CHU d'Angers.

Nouveau Laboratoire Support entrant au prochain mandat :

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice

Correspondant : C. POMARES (AHU)

Le laboratoire du CHU de NICE bénéficie d'une expérience de plus de 30 ans dans le domaine de la toxoplasmose, tant dans la surveillance sérologique des femmes enceintes que du diagnostic prénatal, du diagnostic biologique néonatal et de la surveillance des enfants à risque. Chaque année, une cinquantaine de toxoplasmoses pergestationnelles sont confirmées aboutissant à 20 à 25 diagnostics prénataux. Au sein du laboratoire le Dr. N. FERRET, assure en tant que pédiatre le suivi des enfants dont la mère a fait une séroconversion en cours de grossesse et ceci depuis 20 ans. Le laboratoire réalise environ 8000 dossiers par an dont plus de 10% pour des demandes extérieures au CHU de Nice. Il assure un rôle d'expertise sérologique pour de nombreux laboratoires d'analyses médicales régionaux (entre 50 et 100 laboratoires du secteur public ou privé nous adressent régulièrement des sérums). En plus de ces correspondants, le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie a une relation privilégiée avec les gynécologues-obstétriciens que ceux-ci appartiennent au secteur public ou privé. Le Laboratoire est agréé depuis 1996 pour réaliser le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale. Le Pr P. MARTY et le Dr. C. POMARES ont l'agrément à titre nominatif pour le diagnostic prénatal de

la toxoplasmose congénitale. Ils font aussi partis du comité d'experts d'un fabricant de réactifs (Relais ABBOTT Toxo).

Le Pr P. MARTY et le Dr C. POMARES sont co-responsables du secteur Sérologie de la Toxoplasmose du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice.

4 - Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire (CHU Montpellier)

Pr P. BASTIEN, Responsable

Organigramme CNR du Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire

Prénom	Nom	Fonctions	Appartenance	Temps consacré (ETP)
Patrick	BASTIEN	PU-PH	CHRU Montpellier	0,10
Yvon	Sterkers	MCU-PH		0,10
Emmanuelle	Varlet-Marie	Praticien-Attaché		0,30
	Secrétaire	Secrétariat		0,03
Frédéric	Dalle	PU-PH	CHU de Dijon	0,05
Anne	Lamy / Agnès	Technicien		0,10 total
Hervé	Pelloux	PU-PH	CHU de Grenoble	0,05
Marie-Pierre	Brenier-Pinchart	MCU-PH		0,05
	Technicienne	Technicien		0,05
Laurence	Delhaes	MCU-PH	CHRU de Lille	0,10
Filomena	Naji	Technicien		0,10
Michèle	Vauquier	Technicien		0,10
Hélène	Yera	MCU-PH	AP-HP Paris- Cochin	0,10
Jean	Menotti	MCU-PH	AP-HP St-Louis	0,05
Thierry	Pautet	Technicien		0,05
Feriel	Touafek	Praticien-Attaché	AP-HP Pitié-Salpêtrière	0,10
Denis	Filisetti	MCU-PH	CHU de Strasbourg	0,05
	Technicienne	Technicien		0,05
Sophie	Cassaing	MCU-PH	CHU de Toulouse	0,05
E. Duthu. / S. Gisquet / V. Bans		Technicien		0,10 total
Florence	Robert-Gangneux	MCU-PH	CHU de Rennes	0,10
	Technicienne	Technicien		0,05

Soit au total : 1,83 ETP

Biologistes :	PU-PH	0,20 ETP
	MCU-PH	0,70 ETP
	Praticien-Attaché	0,30 ETP
Techniciens :		0,60 ETP
Secrétariat :		0,03 ETP

Ressources humaines des Laboratoires Supports affectées aux activités du CNR :

Tous les membres du groupe de travail "Biologie Moléculaire" ont une expérience approfondie dans le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose ainsi que d'autres maladies parasitaires et/ou fongiques. Certains ont publié des comparaisons de méthodes de PCR, montrant ainsi leur implication dans la problématique de l'amélioration de ce type de diagnostic. Par ailleurs, l'équipe de Grenoble possède une expérience concernant l'organisation de deux contrôles de qualité au niveau européen.

Tous bénéficient de l'agrément ministériel pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose.

Tous font également partie du réseau du Centre de Ressources Biologiques Toxoplasmose.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Cochin- Port Royal.

Correspondant impliqué : Hélène YERA (MCU-PH)

- Le laboratoire est le premier en France à avoir initié la PCR dans le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (TC). Il a également mis au point le western blot mère-enfant pour le suivi néo et postnatal de la TC. Il possède une grosse activité de sérologie toxoplasmique avec plus de 20 000 sérologies/ an et une activité d'expertise. Il a collaboré avec l'Institut de Puériculture, centre de référence en France pour les sérologies toxoplasmiques, de 2005 à 2009.
- Il réalise également une mission d'information sur la toxoplasmose :
 - 1) organisation d'un séminaire sur la prise en charge de la TC à l'AP-HP en mai 2004;
 - 2) organisation et participation à des séminaires sur la toxoplasmose et transfert de technologies à l'étranger (PCR et WB toxo), en novembre 2000 au CHU Ibn Rochd de Casablanca (Maroc) et en avril 2002 à l'Institut Pasteur d'Alger;
 - 3) organisation de séminaires de recherche sur *T. gondii* ("Clubs Toxo" 2002 et 2004) ;
 - 4) organisation et participation à des séminaires sur la toxoplasmose et transfert de technologies à l'étranger (PCR), en juin 2008 au Laboratoire de référence de la Toxoplasmose (Pr. O. Djurković-Djaković), Institut pour la recherche médicale, Université de Belgrade, Serbie.
- Il participe également aux enquêtes nationales sur la prévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes en France.
- Enfin, l'équipe a eu une activité de recherche plus fondamentale sur l'étude de la signalisation chez *T. gondii* et l'étude du polymorphisme de la superoxyde dismutase chez ce même organisme.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Dijon (EA 562).

Correspondants impliqués : Frédéric Dalle (PU-PH)

- L'équipe bénéficie depuis 1996 de l'agrément ministériel pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose et quatre membres de l'équipe bénéficient d'un agrément individuel pour le diagnostic anténatal de toxoplasmose congénitale. Elle est intégrée au Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal du CHU de Dijon (regroupant obstétriciens, pédiatres et biologistes) avec une action spécifique de suivi des enfants nés de mère ayant développé une toxoplasmose pendant la grossesse. Elle réalise en outre entre 7000 et 10 000 sérologies toxoplasmiques / an.
- Elle réalise également une mission d'information sur la toxoplasmose :
 - 1) Stratégies de prise en charge de la toxoplasmose congénitale : Journée Annuelle du Réseau Périnatal de Bourgogne, à Dijon en 2007 ;
 - 2) Réunion Diagnostic Anténatal : Stratégies du diagnostic de toxoplasmose congénitale : Inter-syndicat des biologistes de la Région Bourgogne- Franche-Comté et Département de F.M.C. de la Faculté de Médecine de Dijon, 2010 ;
 - 3) Stratégies de prise en charge de la toxoplasmose congénitale en France : quatre journées de prévenues en 2011 (Hôpital Chalon s/Saône ; clinique Sainte Marthe, Dijon, Hôpital de Nevers, Hôpital d'Auxerre).
- Le laboratoire est référent pour la toxoplasmose au niveau régional. Il assure de plus des activités de diagnostic prénatal et néonatal au niveau inter-régional (Franche Comté) et au niveau national (CHU de Rouen).
- Le laboratoire est fortement impliqué dans le diagnostic moléculaire des parasitoses et mycoses ; dès 1995 il a développé différents outils de détection de *T. gondii* qu'il a fait évoluer continuellement (PCR conventionnelle, PCR ELISA puis PCR en temps réel : deux cibles sont utilisées dans le laboratoire (REP 529 et B1) et un système de détection des inhibiteurs par contrôle interne a été optimisé). Le laboratoire participe depuis sa création (2002) au contrôle national de qualité organisé par la collégiale ANOFEL. Le laboratoire a ainsi réalisé depuis 1996 plus de 700 analyses dans le cadre du diagnostic pre/post-natal de toxoplasmose congénitale.
- Il a également développé des outils moléculaires de détection de *Cryptosporidium* (1994), *Pneumocystis* (2000), *Entamoeba*, *Giardia* et Microsporidies (2003), *Plasmodium* (2005) et *Acanthamoeba* (2010). Enfin il a développé des outils d'identification, de détection et de génotypage des champignons dans les tissus superficiels et profonds.
- Le laboratoire participe au développement et à la validation de kits commerciaux de diagnostic moléculaire de parasitoses et mycoses en partenariat avec des industriels.

- L'équipe participe aux PHRC nationaux TOSCANE et TOXOGEST portant sur l'évaluation des stratégies thérapeutiques de la toxoplasmose congénitale en France. Le Pr. Alain Bonnin est membre du comité scientifique du PHRC TOSCANE.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Grenoble (CNRS-UJF UMR 5163).

Correspondants impliqués : Marie-Pierre BRENIER-PINCHART (MCU-PH) et Hervé PELLOUX (PU-PH)

- Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble possède une expérience importante et ancienne dans le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose avec des études et des publications depuis 1990.
- L'équipe a en particulier caractérisé une séquence cible originale dans le génome de *T. gondii* et participe à de nombreuses études nationales et internationales sur le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose (collaborations industrielles, projets de recherche clinique, recherche translationnelle).
- H. Pelloux est auteur ou co-auteur d'environ 120 publications internationales et Marie-Pierre Brenier-Pinchart est auteur ou co-auteur de 48 publications internationales, et a adapté la PCR conventionnelle appliquée au diagnostic de la toxoplasmose vers une PCR quantitative en temps réel et a récemment fait évoluer les cibles moléculaires utilisées en fonction des données de la littérature scientifique.
- H. Pelloux a été responsable de deux études européennes de comparaison de méthodes de PCR inter-laboratoires. Il est expert auprès de l'AFSSAPS et participe à plusieurs groupes d'experts dans le domaine du diagnostic de la toxoplasmose. H. Pelloux est membre du conseil scientifique du Centre de Ressources Biologiques national pour la toxoplasmose.
- Par ailleurs, M.P. Brenier-Pinchart a effectué, début 2005, un stage de 3 mois consacré au développement de techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic dans une grande société de diagnostic *in vitro*. Cette collaboration se poursuit actuellement.
- H. Pelloux et MP Brenier-Pinchart sont titulaires de l'agrément ministériel au Diagnostic Anténatal biologique de la toxoplasmose et sont membres du CPDPN de Grenoble et H. Pelloux est membre du conseil scientifique.
- Enfin, depuis plusieurs années, une activité de recherche fondamentale sur l'étude des mécanismes fondamentaux régulant l'infection par *T. gondii* est développée par H. Pelloux et M.P. Brenier-Pinchart au sein de l' UMR 5163 (contrat d'interface INSERM A Hakimi/H Pelloux). Cette UMR regroupe des chercheurs de formation scientifique et médicale permettant ainsi une association forte des compétences, valorisant ainsi la recherche translationnelle.
- Notre activité et notre visibilité internationales dans le domaine sont attestée par nos publications et nos collaborations, comme par exemple l'European Study Group on Clinical Parasitology de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (HP trésorier membre du board du groupe).

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Lille (EA 3609).

Correspondant impliqué : Laurence DELHAES (MCU-PH)

- L'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Lille a précocement mis en place des méthodes moléculaires pour le diagnostic de la toxoplasmose, ainsi que d'autres parasitoses et mycoses (en particulier un travail approfondi sur la détection moléculaire de *Pneumocystis*, d'*Aspergillus fumigatus* ainsi que celle de *Cryptosporidium*).
- L'activité du groupe se développe au sein d'un réseau actif de collaborations régionales entretenu par le rôle référentiel exercé en pratique par ce service dans la région Nord-Pas de Calais.
- Par ailleurs, cette équipe a participé pendant plusieurs années à des programmes de recherche fondamentale en biologie moléculaire sur *Pneumocystis*.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Pitié-Salpêtrière

Correspondant impliqué : Ferial TOUAFEK (Praticien Attaché)

Le laboratoire a dynamisé l'approche diagnostique moléculaire depuis l'an 2000 avec la mise en place de la PCR en temps réel afin d'améliorer la qualité et la rapidité du rendu de ses résultats. Le recul de quatre années lui permet à présent d'apporter des données solides pouvant servir la communauté scientifique (pour exemple : communication au congrès de la Société Française de Parasitologie, Besançon, mai 2005 ; études comparatives inter-laboratoire en cours).

Le Laboratoire est LS du CNR Toxoplasmose depuis 2006. (voir descriptif laboratoire Pôle Sérologie)

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Strasbourg.

Correspondant impliqué : Denis FILISETTI (MCU-PH)

- Le laboratoire de Strasbourg est fortement impliqué dans le diagnostic et la recherche dans le domaine de la toxoplasmose (voir descriptif du Laboratoire Associé Pôle Sérologie).

- Le laboratoire a développé une approche moléculaire pour la détection non seulement de *T. gondii* mais aussi de nombreuses parasitoses : *Entamoeba*, Microsporidies, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Pneumocystis* et *Echinococcus*.
- Le laboratoire élabore et évalue des réactifs employés pour la mise au point de réactifs de diagnostic *in vitro* dans le cadre de contrat de collaboration entre l'industrie et l'université. Il a une grande expérience dans l'expertise indépendante d'outils de diagnostic.
- Pour ce qui est de la recherche au sein de l'Institut, il comporte une équipe qui étudie depuis 1998 les mécanismes cellulaires et moléculaires hôte-parasite chez les Apicomplexa, parasites protozoaires de l'Homme. Cette équipe a été intégrée à l'Unité INSERM U392 en 2002. Ses travaux se sont focalisés sur la physiopathologie de l'infection congénitale à *Toxoplasma gondii* et sur sa prévention vaccinale, ce qui a permis de caractériser partiellement les mécanismes de protection de l'hôte, pré-requis indispensable au développement de nouvelles stratégies préventives. Depuis 2001, l'équipe s'est également intéressée aux mécanismes moléculaires de régulation du passage transplacentaire de *T. gondii*.
- L'équipe a obtenu, pour la période 1999-2006, un contrat de recherche européen Marie Curie dans le cadre de l'étude de la physiopathologie de la transmission transplacentaire de *T. gondii*, et a également coordonné une étude sur l'évaluation du diagnostic immunologique de la toxoplasmose maternelle et congénitale dans le cadre du contrat européen BIOMED2, de 1997 à 2001.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Toulouse

Correspondant impliqué : Sophie CASSAING (MCU-PH)

- Le diagnostic de la toxoplasmose par biologie moléculaire a été implanté dans le laboratoire dès 1993 avec successivement la technique du southern-blot, la PCR Elisa et PCR en temps réel. Cette évolution a nécessité des études comparatives de méthodes, en particulier en ce qui concerne le choix des cibles et amorces. L'expérience du laboratoire dans le diagnostic par PCR s'étend à d'autres parasitoses (*Leishmania*, *Plasmodium*) et aux infections fongiques (*Pneumocystis*, *Aspergillus*). En outre il est équipé d'un séquenceur (ABIPRISM) utilisé en aide au diagnostic d'espèces parasitaires ou fongiques.
- Le groupe de Toulouse est impliqué de très longue date dans le diagnostic et le suivi de la toxoplasmose et est expert auprès de firmes commerciales internationales pour le diagnostic de la toxoplasmose acquise.
- Le service bénéficie depuis 1996 de l'agrément ministériel pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose. Il est par ailleurs accrédité Cofrac (norme 15189) pour le diagnostic des infections parasitaires dont la toxoplasmose que ce soit pour les méthodes sérologiques ou moléculaires.
- Il a participé à plusieurs études multicentriques, nationales et européennes concernant le diagnostic sérologique et moléculaire de la toxoplasmose congénitale.

Pour la prochaine mandature, deux nouveaux laboratoires intégreront le Pôle Biologie Moléculaire avec **une compétence reconnue** dans le domaine de la toxoplasmose **pour les deux membres entrants** :

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint-Louis/Université Paris Diderot

Correspondant impliqué : Jean MENOTTI (MCU-PH)

Expérience dans le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

Responsable du secteur de Biologie Moléculaire du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Saint-Louis depuis 2000 :

- Mise en place du diagnostic de toxoplasmose par PCR chez l'immunodéprimé
- Mise au point et évaluation d'une nouvelle technique de PCR en temps réel pour le diagnostic de toxoplasmose, actuellement utilisée en routine au laboratoire
- Expérience dans le diagnostic moléculaire et le suivi thérapeutique de la toxoplasmose chez l'immunodéprimé (allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, transplantation d'organe, infection par le VIH)
- Membre du réseau du Centre National de Référence sur la Toxoplasmose depuis 2006.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Rennes.

Correspondant impliqué : Florence ROBERT-GANGNEUX (MCU-PH)

Expérience dans le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

Responsable du secteur toxoplasmose au quotidien (sérologie et biologie moléculaire) :

- Inscription sur la liste des praticiens agréés pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose depuis juillet 2008
- Participation au staff du centre de diagnostic prénatal (CPDP)
- Resserrement des liens avec les équipes de gynécologues et pédiatres pour optimiser la filière de suivi des femmes enceintes et des bébés à risque de toxoplasmose congénitale.
- Activité de conseils en matière de traitement et prise en charge de la toxoplasmose auprès de pédiatres et gynécologues de ville et de structures privées (clinique de la Sagesse à Rennes, CHP de Saint-Grégoire,

Polyclinique de St-Brieuc...) ou publiques (CHG de Saint Malo, Redon, Fougères, Guingamp, Pontivy ...). Périmètre de plus en plus large.

- Evaluation de techniques sérologiques.
- Expertises sérologiques pour des laboratoires de ville (activité de conseil et recours)
- Mise à jour régulière d'une base de données sur le suivi des dépistages de toxoplasmose congénitale.
- Membre du réseau CNR Toxoplasmose depuis 2007
- Référent parasitologue local des PHRC nationaux « TOSCANE » et « TOXOGEST »
- Etude clinique sur l'exploration du HLA-G sur liquides amniotiques et hypothèses physiopathologiques dans la toxoplasmose congénitale.
- Expertise antérieure de longue date (CHU Cochin-Port Royal, Paris, 1992-2000) : mise en place de la PCR pour le diagnostic anténatal et chez l'immunodéprimé en pratique de routine, évaluation et introduction en routine du western-blot pour le diagnostic néonatal et pour le diagnostic de chorioretinite toxoplasmique.

C-2 En matière d'équipements et de logistique

Description des locaux (Laboratoire Coordonnateur et Laboratoires Associés) :

Les locaux sont en adéquation avec la réglementation actuelle notamment celle spécifique à la biologie moléculaire. Les Laboratoires du CNR (Coordonnateur et Associés) possèdent l'agrément pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose incluant des locaux dédiés.

En complément, les Laboratoires Supports mettent à disposition leurs locaux et équipements pour participer aux activités du CNR.

1 - Laboratoire Coordonnateur CNR : (CHU Reims)

Adresse : Laboratoire Parasitologie-Mycologie, Hôpital Maison Blanche, CHU Reims, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 REIMS CEDEX

- Locaux universitaires (locaux de recherche, surface : 220m²). Ces locaux regroupent des pièces de culture cellulaire, biologie moléculaire. (Réalisation des génotypes PCR RFLP, mise au point tests de chimiosensibilité)
- Locaux hospitaliers (800m² dont surface dédiée au CNR : 100 m²). Ces locaux sont partagés entre les pièces dévolues au Centre de Ressources Biologiques (pièce de cultures cellulaires avec recueil de souches, multiplication des souches et cryoconservation dans pièce spécifique), une pièce où sont effectuées les sérologies, des locaux dédiés à la biologie moléculaire (en conformité avec la réglementation) et une animalerie agréée à l'intérieur du laboratoire.

Plan général du Laboratoire : voir Annexe

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces :

Secteur	N°pièce	Niveau	Surface	Fonction
Bureaux	27106	1	20 m ²	Responsable CNR Toxoplasmose
	27105	1	10 m ²	Praticien responsable Chimiosensibilité
	27103	1	13 m ²	Praticien Pôle Epidémiologie
	26101	2	20 m ²	Secrétariat CNR
Diagnostic moléculaire	26007	RdC	22 m ²	Pièce technique Pré-amplification et mix
	27008	RdC	18 m ²	Pièce technique Amplification et Post-amplification (PCR en temps réel)
Diagnostic Sérologique	26206	1	65 m ²	Pièce technique (contrôles des sérologies et fabrication antigènes)
CRB Toxoplasma	26001	RdC	15 m ²	Zone de cultures cellulaires, isolement, entretien et multiplication souches, Tests de Chimiosensibilité
	26002	RdC	15 m ²	Zone de stockage cryotubes
Animalerie	27001	RdC	42 m ²	Inoculation prélèvements pathologiques, recueil souches, production antigènes

2 - Laboratoire Associé Pôle Souches : (CHU Limoges)

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Dupuytren, CHU de Limoges

L'activité du CNR du Pôle Souches se déroule dans les locaux du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges où environ 40 m² sont consacrés à cette activité dans plusieurs pièces du laboratoire. Des locaux spécifiques sont dédiés aux activités de biologie moléculaire (en conformité avec la réglementation) et a accès à une animalerie agréée. Une partie du typage moléculaire des souches est réalisée sur les locaux universitaires voisins du CHU.

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces :

Secteur	Niveau	Surface	Fonction
CNR/CRB Toxoplasma	ss CHU	10 m ²	Enregistrement dans logiciel spécifique de gestion de banque
Bureaux	ss CHU	15 m ²	Responsable Pôle Souches
	ss CHU	9 m ²	Responsable génotypage
	ss CHU	12 m ²	Réception, secrétariat
Laboratoires CHU	ss CHU	10 m ²	Traitement des souches
	ss CHU	12 m ²	Stockage azote
	ss CHU	12 m ²	Séquenceur
Laboratoire Faculté	4ème	3x12 m ²	Génotypage

La partie chimiosensibilité des souches est réalisée dans les locaux du Laboratoire Coordonnateur (CHU de Reims).

3 - Laboratoire Associé Pôle Sérologie (CHU/Université Louis Pasteur Strasbourg)

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU/Université Louis Pasteur Strasbourg, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg.

Le Laboratoire a intégré le plateau technique de microbiologie (PTM) inauguré en octobre 2010. L'organisation du PTM prévoit une mutualisation du personnel non médical et des équipements pour la réalisation des analyses. La réalisation des analyses est dévolue aux UF-STAP (Secteurs Techniques d'Activités Partagées) prestataires de service des disciplines et disposant des moyens techniques et des effectifs pour en garantir la qualité.

Le STAP Sérologie (11,7 millions B/BHN, 16 ETP) réalise à partir des prélèvements sanguins, d'une part le diagnostic des infections bactériennes, virales, parasitaires et fongiques. La mutualisation des compétences techniques (15 ETP techniciens) et des équipements (9 automates : Liaison, Architect i 1000 et i 2000, BEP 2000 et BEP 3, Evolis, Mini Vidas, AxSym, Etimax). De plus, le regroupement des échantillons biologiques des patients (partage des tubes primaires, sérothèque commune) optimise la prise en charge des patients.

Le STAP biologie moléculaire (13,6 millions de B/BHN et 16 ETP) est dédié à la détection, la quantification et au séquençage du génome de pathogènes humains par technique de PCR. Il dispose de 16 appareils de PCR dont 8 en temps réel et d'un séquenceur 4 capillaires.

Le laboratoire dispose aussi d'une animalerie agréée et d'un laboratoire de cultures cellulaires.

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces :

Secteur	N°pièce	Niveau	Surface m ²	Fonction
Pré et post analytique	1 à 10	RDC	200	Préanalytique et post analytique
Sérologie 400 m ²	15	RDC	12	Validation biologique
	12	RDC	40	Centrifugation aliquotage
	14	RDC	110	Sérologie automatisée

	18 à 21	RDC	90	Sérologie automatisée (IF, WB, Agglu, ELISA..)
	30 à 32	RDC	85	Chambres froides réactifs et échantillons
	27 et 33	RDC	115	Stockage et gestion sérums et souches
Bio Mol 700 m ²	214 à 218	2	60	Bureaux validation
	209	2	27	séquençage
	210-211	2	12	PCR nichée
	220 à 222	2	36	Salles de mix
	223-226	2	75	Salles d'extraction
	227-228	2	16	Salle de mise en réaction
	229	2	23	PCR automatisée
	205	2	27	thermocycleurs
	207	2	24	révélation
230	2	12	biothèque	

4 - Laboratoire Associé du Pôle Biologie Moléculaire (CHU Montpellier)

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Montpellier, 39 Avenue Charles Flahault (site Antonin Balmès), 34295 Montpellier Cedex 5, France.

Le Laboratoire est installé sur une surface totale de 1300 m² utiles, répartie sur deux étages (voir plan), et divisée pour trois-quarts en locaux hospitaliers et pour un-quart en locaux universitaires de recherche. Les locaux sont entièrement neufs (déménagement en juillet 2009), modernes et hautement fonctionnels. Il bénéficie d'une implantation au cœur du CHRU de Montpellier, et donc, des moyens logistiques (infrastructures, déchets, nettoyage, fournitures de fluides) apportés par son appartenance au CHRU.

Dans le domaine particulier des activités de référence, objet du présent dossier de candidature, le laboratoire possède les locaux et équipements en adéquation avec les missions proposées.

Le secteur de diagnostic moléculaire proprement dit (C.H.U.) occupe environ 70 m².

L'équipe de recherche CNRS-Université Montpellier 1 "Biologie moléculaire des Protozoaires parasites" occupe environ 330 m².

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces.

Secteur	N° pièce	Niveau	Surface	Fonction
Bureaux	PAR1002	1 ^{er} étage	20 m ²	Responsable Pôle Biologie Moléculaire CNR Toxoplasmosse
	PAR0012	RDC	13 m ²	Responsable Diagnostic moléculaire Toxoplasmosse Praticien Attaché Diagnostic moléculaire Toxoplasmosse / CNR Toxoplasmosse
	PAR0041	RDC	30 m ²	Secrétariat, Expédition
Diagnostic moléculaire	PAR0021	RDC	18 m ²	Pièce technique Pré-amplification
	PAR0022	RDC	18 m ²	Pièce technique Pré-amplification
	PAR0025	RDC	33 m ²	Pièce technique Amplification et Post-amplification (PCR en temps réel)

Les locaux spécifiques au diagnostic moléculaire

Il n'y a pas de pièces dédiées spécifiquement au Pôle BM du CNR Toxoplasmosse, mais l'activité de ce dernier se déroule dans les locaux dévolus uniquement au diagnostic moléculaire. Ce "plateau" de biologie moléculaire comporte deux grandes salles (chacune faite de trois box) en surpression, dédiées à la phase pré-amplification, une salle en dépression dédiée à la post-amplification, et un bureau.

Les locaux sont conformes au GBEA et aux recommandations classiques pour cette activité, et même davantage. Des mesures très strictes de confinement et de séparation y sont imposées : organisation en trois locaux géographiquement séparés (préparation des ADN, préparation des mélanges réactionnels, étape post-amplification) avec sas d'entrée ; surpression dans les pièces pré-amplification et dépression dans les pièces post-amplification ; respect du sens du flux ; personnel autorisé ; séparation complète des matériels, blouses, consommables et réactifs ; sur-blouses, sur-chaussures ; autres mesures classiques de prévention des contaminations. De plus, ce plateau de biologie moléculaire bénéficie de

deux aires distinctes dédiées à la pré-amplification : l'une réservée à la routine, l'autre au développement (en particulier les activités du CNR).

Description des équipements :

Le CNR dispose des équipements nécessaires pour les études sérologiques : automates de sérologie diversifiés couvrant le panel des techniques actuellement sur le marché et techniques manuelles, et pour les études en biologie moléculaire : PCR temps réel et PCR conventionnelle couvrant le panel des techniques actuellement sur le marché. La diversité des automates présents dans les différents laboratoires constituant le CNR (Laboratoires Coordonnateur, Associés et Supports) pour les activités de sérologie et de biologie moléculaire, permet d'assurer une expertise complète dans ces domaines.

Les laboratoires des Pôles Epidémiologie et Souches disposent de hottes PSM et d'animaleries agréées (zone A2) pour le recueil et l'entretien des souches et de cryoconservateurs à azote liquide sécurisés pour leur stockage (cryoconservateurs sous alarme de température), de séquenceurs pour le génotypage. Ils ont développé un logiciel spécifique à la gestion des souches incluses dans le CRB Toxoplasma avec traçabilité complète des échantillons et des événements. Ils participent à l'élaboration, pilotée par l'Institut Pasteur, d'un logiciel commun à l'ensemble des CRB micro-organismes suite à un appel d'offres IBSA.

Les Laboratoires Associés Pôle Sérologie et Biologie Moléculaire disposent également de hottes PSM et d'animaleries agréées. Certains laboratoires membres du réseau du CNR disposent également d'animalerie, cependant leur nombre tend à diminuer à cause du coût des animaleries et des performances du diagnostic par Biologie Moléculaire. Les Laboratoires Coordonnateurs et Associés seront probablement à l'avenir des centres référents pour l'inoculation à la souris, seule méthode permettant l'isolement de souches de toxoplasmes. Un certain nombre de laboratoires membres du réseau envoient leurs prélèvements positifs en Biologie Moléculaire vers ces laboratoires pour inoculation à l'animal et récupération des souches.

Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire :

Le laboratoire possède un plateau technique performant, comportant

- 1 thermocycleur en temps réel Roche® ; deux thermocycleurs classiques;
- 1 automate d'extraction d'ADN Roche®
- une unité de culture (niveau P2), et une enceinte confinée de niveau P3, équipée respectivement de 3 et 2 postes de sécurité microbiologiques;
- quatre appareils d'électrophorèse en champ pulsé ;
- de nombreux équipements courants : cuves et générateurs pour électrophorèse, station de prises de vues numériques avec analyseur d'images, centrifugeuses, étuves à CO₂, microscopes, balances, bains secs, bain-marie, pH-mètres, fours à hybridation, congélateurs (- 20°C et - 80°C), containers de cryo-conservation, chambre noire...

Laboratoire Associé Pôle Sérologie : voir descriptif avec locaux .

C.3 Bref descriptif des thématiques de recherche

C-3.1 Laboratoire Coordonnateur

Le Laboratoire Coordonnateur centre ses thématiques de recherche au sein d'une équipe de recherche labellisée par le Ministère (EA3800, Pr Villena) sur les « interactions Cellules-Toxoplasme : biodiversité, pathogénie, résistance) avec déclinaison en deux volets d'étude :

1- Etude de la circulation dans l'environnement des protozoaires pathogènes (incluant *T. gondii*) pour l'homme à transmission alimentaire/hydrique.

- Le rapport AFSSA (2005) avait identifié plusieurs domaines d'investigation prioritaires afin d'acquérir les données manquantes pour la réalisation d'une appréciation quantitative du risque de la toxoplasmose liée à l'alimentation. Nous avons participé en collaboration avec le LNR « Parasites transmis par l'alimentation » de l'ANSES à différentes enquêtes épidémiologiques sur les animaux de

rente. Nous poursuivrons l'étude des modes de contaminations concernant les viandes de cheval, de porc et d'ovins pour mieux caractériser le risque de contamination humaine. Ainsi, une étude de la mise en évidence et de la caractérisation de *T. gondii* dans des tissus ovins infectés naturellement et expérimentalement est en cours (Thomas M, Thèse ANSES). Ces programmes se déroulent au sein de l'USC Epitoxo.

- L'étude de la contamination d'autres matrices alimentaires par *T. gondii* sera réalisée dans le cadre d'un programme ANR (Alia, Protofood 2010-2013) en complément de celle d'autres protozoaires les plus fréquemment impliqués dans les infections alimentaires (*Cryptosporidium* spp. *Giardia duodenalis*). Les objectifs sont de i) mettre en place une stratégie globale permettant d'extraire ces parasites de mollusques bivalves et de végétaux, de détecter et de caractériser les trois pathogènes ii) mieux appréhender les modalités de contamination des aliments, en étudiant les mécanismes de bioaccumulation et de dépuration des mollusques et la persistance de ces parasites à la surface de matrices végétales; iii) de caractériser l'impact de la cuisson domestique sur la viabilité de ces parasites. Ce programme implique de nombreux partenaires académiques dont certains membres du CNR de la Toxoplasmose (équipe de Rouen et Lille), avec une thèse en cours (Hohweyer J, 2010-2012).

- La partie relative à l'étude de la contamination du sol et à la circulation des oocystes a été étudiée dans le cadre de deux thèses (Afonso E, 2007 et Lelu M, 2010) réalisées avec le soutien d'un programme AFSSET 2006-2009 (Dynamique environnementale de *Toxoplasma gondii*), ces travaux ont permis l'optimisation des méthodes de détection des oocystes de *T. gondii* dans le sol. La dynamique de la contamination environnementale par *T. gondii* sera documentée par une étude plus large de la circulation de la forme oocyste de *T. gondii* dans le sol et l'eau et la contamination des micro-mammifères qui en découlent (Programme AFSSET/ADEME 2010-2013, Thèse Gotteland C et Forin-Viard MA). L'équipe de Limoges (Pr Dardé) collabore également à ces programmes de recherche.

2- Pathogénicité de *Toxoplasma gondii*

- Nous étudions l'implication d'une ou de protéase(s) parasite(s) dans la pathogénicité de *T. gondii*. La capacité de ce parasite à traverser la matrice extra-cellulaire sera documentée par l'étude de la régulation de métalloprotéinases matricielles dans un modèle *in vitro* de cellules monocytaires infestées par *T. gondii* dans le cadre d'un projet Contrat Plan Etat Région (CPER) Champagne-Ardenne 2009-2012 intitulé « Métalloprotéases toxoplasmiques : de la caractérisation à la synthèse d'inhibiteurs sélectifs » au cours d'une thèse d'Université (Bouleau AP, 2011-2013). Une protéase a été identifiée au cours de précédents travaux (thèse Buache, 2007), elle sera purifiée et clonée, puis caractérisée (par substrats synthétiques et sensibilité aux inhibiteurs), son implication dans l'invasion de *T. gondii* sera recherchée en modèle *in vitro*, et des inhibiteurs sélectifs seront réalisés par des équipes de Biochimie en collaboration sur ce projet.

- Un autre aspect de la pathogénicité réside dans la résistance des souches de *T. gondii* aux anti-toxoplasmiques. Après avoir démontré l'existence de résistances à la sulfadiazine, nous n'avons pas observé, pour les deux cibles thérapeutiques (DHFR et DHPS) et les ABC transporteurs toxoplasmiques explorés, de lien entre résistance et surexpression ou polymorphisme. L'utilisation de la cytométrie en flux pour visualiser la fonctionnalité des ABC a mis en évidence une augmentation de l'efflux de substrats fluorescents liés à l'activité des P Glycoprotéines (famille des ABC) dans les souches résistantes. Afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la résistance aux sulfamides, la ou les protéines impliquées dans la résistance chez *T. gondii* seront caractérisées en étudiant les différences entre profils protéiques des souches sensibles et résistantes (thèse d'Université Doliwa C, 2009-2012). Ce travail se déroule en collaboration avec le Pr Wastling (Université Liverpool).

C-3.2 Laboratoire Associé Pôle Souches

Les projets de recherche du Pôle Souches s'inscrivent au sein de l'EA3174 et bénéficient des données accumulées grâce au CNR et au CRB Toxoplasma. Ils peuvent être divisés en trois axes principaux :

1. Diversité génétique de *Toxoplasma gondii*

- L'exploration de la distribution mondiale des génotypes de toxoplasmes sera poursuivie grâce notamment à une collaboration avec une équipe des USA (C. Su, Tennessee, et JP Dubey, USDA, Maryland). Cette équipe dispose de plus de 900 isolats provenant de diverses espèces animales de différents continents. Elle a développé des marqueurs génétiques différents (PCR-RFLP) des nôtres. En confrontant les données de génotypage obtenues par les deux méthodes, nous allons pouvoir proposer, au niveau international, une liste de souches de référence et essayer d'élaborer un consensus dans la dénomination des génotypes de *T. gondii*. Ceci devrait permettre une clarification du regroupement des

souches nécessaire pour les chercheurs qui, à travers le monde, veulent entreprendre des études sur les génotypes de toxoplasmes. Ce regroupement sera également une base pour mieux appréhender les relations génotypes-virulence.

- Cette vaste étude collaborative est le prélude à la sélection de souches les plus représentatives possible de la diversité génétique de *T. gondii* pour un projet de séquençage complet du génome de différentes souches de toxoplasmes. Notre équipe fait partie du comité d'organisation du projet soumis au NIAID Genomic Sequencing Centers for Infectious Diseases (D. Sibley, St Louis, MO, USA). Les souches seront déposées à l'ATCC et au BRC *Toxoplasma*. L'étude propose le séquençage complet "high-coverage" du génome de 9 nouvelles souches prototypiques et un séquençage avec une couverture plus limitée de 41 souches supplémentaires pour explorer la diversité génétique.

2. Epidémiologie moléculaire spatialisée de *T. gondii*

Une collaboration avec l'Université de Lyon 1, CNRS, UMR 5558, (Sébastien Devillard) permettra des avancées dans ce domaine :

- *La structure génétique de la population de T. gondii* sera étudiée en analyse en composantes principales (DAPC). Cette analyse portera sur les données génétiques des 15 marqueurs microsatellites sur l'ensemble de la collection du CRB *Toxoplasma* et du Pôle Souches du CNR, soit environ 1000 souches et ADN provenant d'Europe et d'Amérique principalement mais également d'Afrique et d'Asie. Les souches animales et leurs groupes géographiques *a priori* seront utilisées pour réaliser la DAPC et ré-assigner les souches humaines dans les groupes *a priori*. Ceci permettra d'identifier l'origine géographique des souches atypiques souvent importées et à l'origine de cas sévères. Grâce à ces informations, nous pourrions également mieux cibler l'interrogatoire épidémiologique dans l'identification de la source de l'infection (voyage à l'étranger ou consommation de viande importée).

- Grâce aux données épidémiologiques associées aux souches (adresse des patients) et aux données génétiques des 15 marqueurs microsatellites, la *spatialisation de la distribution des souches de type II à l'origine de toxoplasmose congénitale en France* sera étudiée en Analyse composante spatialisée (sPCA). La sPCA appliquée aux génotypes multilocus de type II contribuera à répondre à la question de l'origine de la contamination des femmes enceintes en France. Des résultats préliminaires montrent que ces génotypes se distribuent différemment selon les régions. Il existe une structuration nette des souches en zone rurale de la région Pays de Loire, suggérant une part importante de contamination d'origine locale (sol, légumes, et viande produite localement) en milieu rural dans cette région. Ces données obtenues chez l'homme seront renforcées par les données sur les génotypes de toxoplasmes isolés d'animaux et de l'environnement grâce à une collaboration avec l'EA 3800 (Reims, équipe associée à l'ANSES) et à un projet AFSSET sur la dynamique de la contamination environnementale par le toxoplasme (UMR 5558).

3. Toxoplasmose humaine : étude des corrélations génotypes/expression clinique et des facteurs de risque

3.1. Corrélations génotypes/expression clinique de la toxoplasmose

- Grâce au réseau du CNR Toxoplasmose, le rôle du génotype sera mieux précisé dans la toxoplasmose congénitale en France, en particulier dans les formes sévères neuro-oculaires et dans les formes avec rétinocoroïdite qui se manifestent souvent de façon retardée par rapport à la naissance. Sur les 550 cas de toxoplasmose congénitale pour lesquels la souche responsable a été génotypée, l'objectif est de pouvoir récupérer dans au moins 50% des cas les données du suivi clinique (ophtalmologique) de l'enfant jusqu'à 5 ans.

- Il semblerait que des souches inhabituelles circulent dans la péninsule indienne comme en témoignent les cas d'encéphalite décrits chez des immunocompétents dans la région de Lucknow (Uttar Pradesh) ou la survenue d'une des plus vastes épidémies de toxoplasmose oculaire à Coimbatore (Tamil Nadu). Un travail de thèse (bourse régionale) sera entrepris dans ces deux régions, en collaboration avec l'Université du Tamil Nadu (Dr Sreekumar) pour isoler des souches circulant dans l'environnement de ces patients, en particulier à partir d'animaux domestiques. Ces souches asiatiques enrichiront également la thématique de nos deux premiers axes décrits plus haut (diversité génétique de *Toxoplasma gondii* et épidémiologie moléculaire spatialisée de *T. gondii*).

3.2. Facteurs de risque de la toxoplasmose humaine

Un travail préliminaire en cours de publication laisse supposer un rôle de la viande de cheval dans la survenue de cas de toxoplasmoses sévères en France. Cette viande est souvent consommée crue en France, sans congélation préalable. Elle est en grande partie importée notamment du continent

américain (Canada, Mexique, Brésil, Argentine et Uruguay) où il existe une très grande diversité génétique de *T. gondii* avec des souches atypiques ayant une plus grande pathogénicité que les souches de type II. Une étude pilote pour l'ANSES est en cours pour estimer le risque sanitaire lié à la consommation de viande de cheval en France. Les souches isolées majoritairement américaines enrichiront également la thématique de nos deux premiers axes décrits plus haut (diversité génétique de *Toxoplasma gondii* et épidémiologie moléculaire spatialisée de *T. gondii*).

C-3.3 Laboratoire Associé Pôle Sérologie

Nos activités de recherche au sein de l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale se sont diversifiées en 3 grands thèmes

La thématique de recherche sur la toxoplasmose s'est d'abord orientée sur la physiopathologie de la toxoplasmose congénitale et nos derniers travaux sur ce thème se sont achevés au cours du plan quadriennal 2005-2008 (voir les articles d'A. Pfaff, O. Villard et A. Sénégas). Nous nous sommes actuellement centrés sur les infections oculaires et sur les mécanismes moléculaires de persistance du parasite dans la cellule hôte oculaire. Il s'agit d'un thème peu étudié et dont les modélisations animales sont peu développées. Nos travaux visent à explorer la nature de la réponse immunitaire et inflammatoire tant chez l'Homme que chez l'animal. Ils sont financés à partir d'une dotation ministérielle, des expertises et un PHRC.

La recherche clinique sur la toxoplasmose oculaire est effectuée dans le cadre d'un PHRC et d'un contrat avec une équipe de recherche colombienne (Dr Jorge Gomez-marin, Université de Quindio), Colciencias (CNRS colombien) finançant les deux partenaires colombien et français. Des échanges d'étudiants et de scientifiques sont en cours entre nos deux laboratoires (1 master Alejandro Hernandez de los Rios (M2) ; trois doctorants : Alejandra de la Torre (D2), Arnaud Sauer (D2) et Elise Rochet (D1). Les premiers résultats de nos travaux ont été publiés depuis 2009 (Lahmar I. *et al.* JID 2009; Sauer A. *et al.* ; J Fr Ophtalmol. 2009 ; Lahmar I. *et al.* Exp Parasitol. 2010 ; Sauer A. *et al.* 2011)

Dans le cadre de nos travaux sur les mécanismes de la latence parasitaire dans l'œil, nous effectuons des travaux (un post-doctorant J. Brunet ; un doctorant G. Kanjo (D3) ; un master : M. Sabou (M2)) sur la régulation par le parasite des voies de signalisation et du cycle cellulaire de la cellule hôte. Ces recherches sur les mécanismes de régulation épigénétiques de la cellule hôte par *Toxoplasma gondii* et ses implications immuno-pathologiques sont originales (Brunet J. *et al.*, Cellular Microbiology, 2008 ; Unoki M. *et al.* Biochem Pharmacol, 2009). Des collaborations sont en cours avec l'université de Tokyo (Dr M. Unoki) et avec la nouvelle équipe du Professeur Rohr qui a intégré le laboratoire en 2010 et travaille sur une thématique similaire dans la physiopathologie de l'infection par le VIH.

C-3.4 Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire

Dans le domaine de la toxoplasmose, le LA "Pôle Diagnostic moléculaire" a une activité de recherche appliquée au diagnostic ; il a publié plusieurs articles ou chapitres d'ouvrage sur le diagnostic prénatal, sur la mise au point ou la comparaison de méthodes moléculaires de diagnostic, sur le Contrôle de Qualité en PCR-*Toxoplasma*, et sur la diversité des méthodes de diagnostic moléculaire utilisées au niveau national.

Les Laboratoires-Supports (LS) ont tous également publié sur un ou plusieurs de ces sujets. Un d'entre eux mène en outre une activité de recherche fondamentale sur le parasite (génétique et perspectives thérapeutiques).

Le nouveau LS de Paris-St-Louis fait preuve d'un intérêt de très longue date sur la toxoplasmose, aussi bien sur des aspects de chimiosensibilité des souches que sur le diagnostic. Le Dr J. Menotti (membre du nouveau groupe de travail) a publié récemment (2010) une méthode originale de PCR en temps réel pour cette maladie.

Le nouveau LS de Rennes (en la personne du Dr Florence Robert-Gangneux) a également publié plusieurs articles spécifiquement sur le diagnostic moléculaire et son intérêt dans la toxoplasmose congénitale.

Tous deux sont membres du réseau du CNR Toxoplasmose depuis sa création.

(Voir le descriptif capacités humaines de ce Pôle)

C.4 Capacités techniques actuelles du laboratoire candidat et Laboratoires Associés.

C-4.1 Liste des techniques déjà disponibles pour le diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

1 - Les techniques de typage des souches ou ADN toxoplasmiques (Pôle Souches)

Elles reposent sur 15 marqueurs microsatellites et 3 marqueurs de PCR-RFLP. La technique PCR multiplex permettant d'amplifier lors d'une seule PCR les 15 marqueurs microsatellites a été développée en 2010. Elle est maintenant appliquée systématiquement à tous les prélèvements et permet grâce à son pouvoir discriminant élevé un traçage épidémiologique. Dans le cadre d'une démarche qualité, a été mis en place un contrôle interne en simple aveugle avec extraction anonymisée de l'ADN de souches connues suivi d'un génotypage. La validation de l'extraction et du génotypage se fait par comparaison du génotype obtenu avec le génotype attendu.

Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

15 marqueurs microsatellites (site de Limoges – Ajzenberg et al. JCM 2010) :

PCR-RFLP sur gènes *SAG2*, *SAG1*, *GRA7* (site de Reims)

Séquençage occasionnel de *GRA6*, *GRA7* (site Limoges)

Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. Genotyping of Toxoplasma gondii isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. 2010 Dec;48(12):4641-5.

2 - Les techniques d'évaluation de la chimiosensibilité (Pôle Souches)

L'évaluation de la chimiosensibilité des souches de toxoplasmes était initialement réalisée par le laboratoire du Pr Derouin (jusqu'en 2009) au sein du Pôle Souches, sur un modèle de cellules MRC5 développé dans son unité avec lecture optique des cultures cellulaires infestées en présence de concentrations croissantes de médicaments et en ELISA (lecture de DO). Une CI50 avait été définie sur ce modèle et trois souches se sont révélées résistantes à la sulfadiazine (première description de souches naturellement résistantes).

Cette évaluation a été reprise par le Laboratoire du Pôle Coordonnateur au sein du Pôle Souches (D. Aubert), et nécessite une adaptation de ce test sur une autre lignée cellulaire (Cellules VERO) moins contraignante. Ces travaux sont en cours de finalisation. Après mise en culture des cellules VERO, elles sont infestées par les souches à étudier, l'ajout de sulfadiazine se fait à des concentrations croissantes, la croissance des parasites en cultures est observée au microscope après coloration jusqu'à l'obtention d'un très petit nombre de foyers voire l'absence totale de parasites. Parallèlement, une quantification est faite par mesure des DO en méthode ELISA après immunomarquage des parasites. Le passage d'une vingtaine de souches nous permettra par calcul statistique de définir les CI50 attendues. Ensuite, nous développerons une méthode de criblage de la chimiosensibilité à partir de 4 points de la gamme des concentrations en drogue entourant la valeur de sensibilité moyenne des souches. En cas de résistance ou de valeur intermédiaire, la souche sera testée selon la méthode de référence et complétée par des techniques de mesure d'efflux de sonde (rhodamine et/ou calcéine-AM en présence ou non d'inhibiteurs) en cytométrie en flux.

3- Techniques pour le diagnostic sérologique (pratique du diagnostic et interprétation des résultats) :

Le Laboratoire Associé et les Laboratoires Supports correspondant au Pôle Sérologie disposent des techniques classiques commercialisées et diffusées aux laboratoires de biologie polyvalente et de techniques « maison » ou spécifiquement développées au sein des laboratoires du réseau du CNR et des Laboratoires Associés permettant une expertise des sérologies « à problème ».

Une bibliothèque est constituée permettant l'évaluation des kits de diagnostic immunologique commercialisés en France (techniques manuelles et automatisées). Les modalités d'expertise des réactifs sérologiques ont été définies permettant une analyse objective des réactifs par les laboratoires membres du Pôle Sérologie. Les résultats (partiels) sont disponibles dans le rapport.

Un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques et conduite à tenir a été validé par le groupe de travail du Pôle Sérologie et les membres du réseau permettant une harmonisation des pratiques, il est a

été publié en 2011 (Feuillets de Biologie, 2011,208, 43-49) et est mis en ligne sur le site Internet du CNR.

Toutes les techniques utilisant des méthodes ELISA sont disponibles au sein du Laboratoire Associé et des Laboratoires Supports, permettant de tester l'ensemble des trousse commercialisées pour le diagnostic immunologique de la toxoplasmose ; en outre ces laboratoires possèdent les techniques de référence (immunofluorescence, agglutination directes, western-blot) et ont la capacité d'avoir recours au dye-test (laboratoire des CHU de Marseille et Limoges).

4- Techniques pour le diagnostic par biologie moléculaire (pratique du diagnostic et interprétation des résultats) :

Le Laboratoire Associé et les Laboratoires Supports correspondant au Pôle Biologie Moléculaire disposent de techniques « maison » ou spécifiquement développées au sein des laboratoires membres du réseau du CNR. L'accès à ces techniques est plus restreint dans le cadre du diagnostic moléculaire étant donné l'indisponibilité de trousse commercialisées, cette pratique est donc réservée aux laboratoires de CHU et aux laboratoires agréés pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale.

La constitution du Pôle "Biologie Moléculaire" permet de disposer d'un vaste panel de techniques de diagnostic moléculaire, représentatif des méthodes utilisées au niveau national et essentiel pour les études comparatives : PCR conventionnelle avec révélation sur gel, PCR conventionnelle avec révélation en ELISA, PCR en temps réel utilisant diverses technologies (Light-Cycler + sondes FRET, ABI Prism + sondes TaqMan, ABI Prism + sondes Taqman MGB).

Par ailleurs, Tous les Laboratoires de ce Pôle (LA et LS) font preuve d'une expertise dans le domaine du diagnostic moléculaire de la Toxoplasmose. Tous maîtrisent la PCR en temps réel, qu'ils pratiquent en routine dans leur activité hospitalière, sous forme de techniques "maison" ou spécifiquement développées au sein des laboratoires. L'organisation en réseau de ce Pôle permet l'accès à une panoplie de techniques importante et essentielle pour les études comparatives qui sont au cœur de ce Pôle : deux types de cibles ADN, cinq paires d'amorces, cinq types de thermocycleurs, trois types d'extracteurs automatisés, sondes FRET et TaqMan,... Le LA lui-même répond à environ 1300 demandes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose par an. Préoccupé et impliqué au premier chef dans l'évaluation des techniques de diagnostic moléculaire depuis plus de 10 ans, le LA a accumulé à la fois une capacité technique, une réflexion et une expertise, exceptionnelles dans le domaine.

Le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire a développé le Contrôle National de Qualité en biologie moléculaire pour le diagnostic de cette affection. L'ensemble des laboratoires membres du réseau participent à ce contrôle qui a lieu annuellement, leur permettant une évaluation de leur pratique diagnostique. En 2010, une extension des compétences de ce Pôle lui a permis de collaborer au QCMD (contrôle de qualité européen), en fournissant notamment les matrices à évaluer (sang total et liquides amniotiques) et le matériel infectieux (souche de toxoplasme en quantité connue). Le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire a fabriqué une gamme étalon qu'il peut distribuer aux laboratoires membres du réseau ; leur permettant de s'étalonner pour la détermination de la charge parasitaire présente dans un échantillon (PCR quantitative).

La recommandation de pratiques et de techniques/méthodes de diagnostic moléculaire fait partie des objectifs de ce Pôle. Néanmoins, cet objectif a été placé en deuxième intention en raison de la complexité des analyses (toutes "artisanales"), ce qui implique des études comparatives poussées avant de pouvoir parvenir à un consensus sur ce sujet délicat.

C-4.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles

1- Collection de souches :

Description : nombre de souches, caractérisation

Le CNR a été créé en 2006. Nous avons intégré à ce bilan global les souches et ADN adressés antérieurement au CRB (créé en 2002).

1146 prélèvements ont été adressés au Pôle Souches du CNR : 665 souches isolées par inoculation à la souris et 481 ADN parasitaires extraits de produits pathologiques.

Nature de prélèvements	Génotypage direct 2002-2010			Génotypage souches 2002-2010			
	succès	échec	total direct	succès	échec	total souches	
Sang / Moelle osseuse	102	37	32	69	32	1	33
LCR	64	23	40	63	1	0	1
Cerveau/Moelle épinière	45	23	6	29	16	0	16
Poumons/LBA	64	37	14	51	13	0	13
Humeur aqueuse/Vitré	132	36	96	132	0	0	0
placenta	419	32	15	47	362	10	372
sang du cordon	41	7	2	9	31	1	32
tissus fœtaux	20	10	0	10	8	2	10
Liquide amniotique	242	43	14	57	179	6	185
Divers	17	8	6	14	3	0	3
Total	1146	256	225	481	645	20	665

Tableau 1 : Nature des prélèvements adressés au CNR et résultats du génotypage.

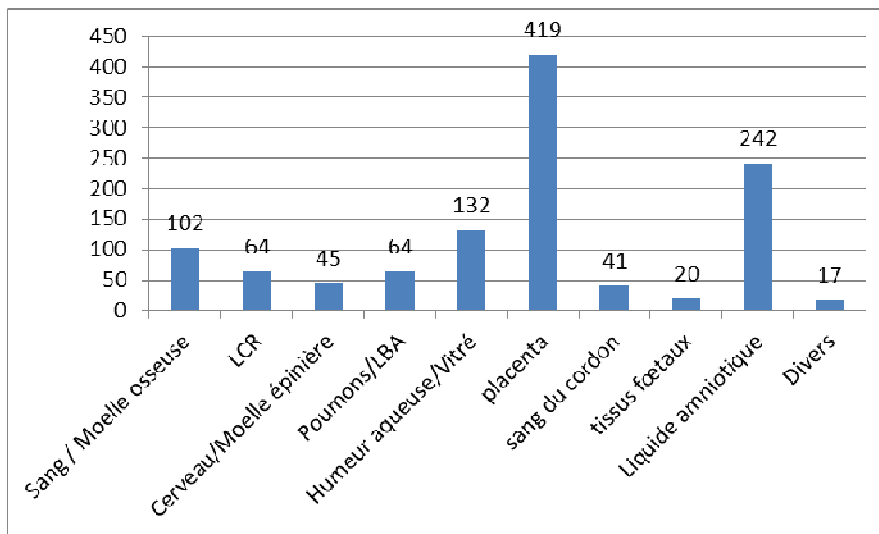


Figure 1 : Distribution de la nature des prélèvements adressés au CNR pour génotypage

Les prélèvements provenant des cas de toxoplasmose congénitale (liquide amniotique, placenta, sang du cordon, tissus fœtaux) représentent 63% des prélèvements (722/1146).

Le succès de leur caractérisation est variable en fonction de la nature de l'envoi (souche ou ADN issus de produits pathologiques).

- Les souches représentent 58,02% des prélèvements adressés au CNR. 97% ont pu être génotypés avec succès. Elles sont confiées au CRB *Toxoplasma*, après accord de cession des déposants.
- Les extraits ADN provenant de produits pathologiques des patients représentent 41,97% des prélèvements adressés au CNR. 53,22% ont pu être génotypés.

Au total, 901 prélèvements, soit 78,62%, ont été caractérisés.

Dans le cadre d'une activité de recherche ou de surveillance des souches à l'origine de la contamination humaine, la collection du CRB comporte également des souches d'origine animale : 163 provenant d'animaux domestiques ou sauvages prélevés sur le territoire métropolitain, 1 du Canada (viande de cheval, achat sur le territoire français), 21 d'animaux domestiques du Portugal. Des souches d'animaux domestiques du Gabon et de Guyane Française sont en cours d'intégration au CRB.

Condition de stockage :

Les souches sont stockées en azote liquide à Reims et à Limoges dans des cryoconservateurs sous alarme de température. Le stockage est contrôlé via le logiciel développé spécifiquement pour le CRB *Toxoplasma*. La mise en banque d'aliquotes est enregistrée dans le logiciel permettant d'assurer la traçabilité du stockage. Un nouveau logiciel est en cours de réalisation dans le cadre d'un projet supporté par IBiSA et qui rassemble les CRB micro-organismes

Les ADN extraits de produits pathologiques sont stockés à -80°C dans un congélateur sécurisé (alarme de température). Pour ces derniers, la déclaration de collection conforme au décret n°2007- 1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain a été faite en 2008 à Reims et à Limoges au titre des collections des CHU respectifs et déclarée acceptable.

Conditions de mise à disposition des collections :

Les souches, avec l'accord de cession signé du biologiste responsable de l'isolement, sont destinées à être disponibles pour des projets scientifiques. Elles sont alors intégrées à la structure Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma*. Un site Internet avec catalogue a été créé (<http://www.toxocrb.com>) exposant les conditions de dépôt et de cession des souches. Les subcultures de la souche déposée au CRB *Toxoplasma* sont distribuées à la communauté scientifique, après avis d'un conseil scientifique, moyennant un coût permettant de couvrir les frais encourus par la préparation et la conservation. Cette activité de cession ne concerne que les souches, et non l'ADN issu de produits pathologiques humains. Le déstockage des souches est contrôlé par le logiciel du CRB permettant la traçabilité de la sortie des aliquotes cédés.

2- Antigènes :

Le Laboratoire Coordonnateur procède à la fabrication d'antigènes solubles et figurés de *T. gondii* issus de la souche RH. Ces antigènes sont produits par inoculation intra péritonéale à des souris de la souche RH, recueil de l'ascite produite, traitement des toxoplasmes par trypsination et formol avant validation technique pour l'antigène figuré. Pour l'antigène soluble, l'étape de recueil des tachyzoïtes est suivie par une trypsination puis des cycles de congélation/décongélation avant validation.

Ces antigènes peuvent être mis à la disposition des membres du CNR désireux de tester des sérums par techniques d'agglutination (ADHS, agglutination directe de haute sensibilité) de même principe que le test commercialisé par Biomérieux (Toxoscreen®). Plus largement, ces antigènes peuvent être fournis à divers laboratoires de recherche pour des études épidémiologiques.

3- Sérums et matériel biologique de référence :

Le Laboratoire Associé du Pôle Sérologie

Le Laboratoire Associé Pôle Sérologie contribue à la constitution d'une sérothèque destinée à l'expertise de réactifs. Cette sérothèque est alimentée par l'ensemble des membres du réseau du CNR Toxoplasmose.

Un des projets du Pôle Sérologie sera la production et la validation d'un contrôle interne « extériorisé » qui pourrait être utile dans le cadre de la validation des méthodes afin d'avoir un contrôle inter laboratoires qui fait actuellement cruellement défaut.

Le Laboratoire Associé du Pôle Biologie Moléculaire procède à la fabrication et distribution de matériel biologique dit "étalon" (ADN, témoins positifs, gammes, échantillons artificiels) destiné à être envoyé (i) en priorité aux membres du groupe de travail en vue de l'évaluation et de la standardisation du diagnostic moléculaire; (ii) dans un second temps aux membres du réseau du CNR avec le même objectif; (iii) dans le futur ce matériel pourra être fourni aux biologistes désireux d'améliorer ou de mettre en place ce diagnostic moléculaire.

D. BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

Le CNR de la Toxoplasmose, créé en 2006, a assuré pendant son premier mandat (2006-2010) une structuration en réseau reposant sur l'ensemble des laboratoires spécialisés dans le diagnostic de la toxoplasmose (acquise, congénitale, de l'immunodéprimé) sur le territoire national (et DOM-TOM). Pour remplir ses différentes missions d'expertise, de contribution à la surveillance et à l'alerte, et enfin de conseils aux professionnels et autorités de santé, le CNR s'est structuré autour de quatre Pôles d'activités. Ainsi le Laboratoire Coordonnateur (Pôle Epidémiologie) assisté de trois Laboratoires Associés (Pôle Souches, Pôle Sérologie, Pôle Biologie moléculaire), a entrepris depuis sa création, différentes actions répondant bien aux missions qui lui ont été confiées. Le réseau du CNR participe activement aux différents travaux et permet d'assurer un enrichissement continu des connaissances dans le domaine de la toxoplasmose. Le CNR poursuit ses activités toujours en lien avec les laboratoires de son réseau mais aussi avec les laboratoires d'analyses médicales (privés ou publics hospitaliers) exerçant un rôle dans le diagnostic de cette affection (par exemple en faisant participer ces laboratoires à diverses enquêtes afin d'identifier mieux les pratiques de diagnostic) dans le souci d'une aide aux professionnels de santé.

D.1 Activité au titre de l'expertise microbiologique

Le CNR de la Toxoplasmose est régulièrement contacté pour des expertises diagnostiques principalement chez des femmes enceintes pour préciser la datation d'une infection toxoplasmique ou réaliser le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale, chez les nouveau-nés et enfants susceptibles d'atteinte congénitale (confirmation de diagnostic) et chez les immunodéprimés (diagnostic de réactivation toxoplasmique le plus souvent). En outre, il est amené à réaliser le diagnostic de la maladie chez les patients immunocompétents dont le tableau clinique est compatible avec celui d'une toxoplasmose.

Le CNR de la Toxoplasmose étant constitué sous la forme d'un réseau de laboratoires experts en Parasitologie Médicale et particulièrement dans le domaine de la toxoplasmose, chacun des laboratoires constitutifs assurent ces missions d'expertise en mettant en œuvre les analyses nécessaires au diagnostic : analyses sérologiques (avec l'emploi de techniques plus spécialisées que celles présentes dans les laboratoires privés ou public polyvalents, techniques plus sensibles et plus spécifiques) , analyses en biologie moléculaire (non réalisées dans les laboratoires privés) et détection des toxoplasmes par inoculation à la souris. L'ensemble des laboratoires du CNR (34 au total) ont développé un réseau de correspondants (laboratoires d'analyses médicales, gynécologues-obstétriciens, pédiatres, infectiologues, ophtalmologues, médecins généralistes) propre à chacune de leur région et participent ainsi à ces activités d'expertise.

Capacités techniques du CNR

D-1.1 Collections de souches

Un objectif important pour la surveillance et le cas échéant l'alerte, réside dans la collecte des souches responsables de toxoplasmose en vue de leur caractérisation génotypique et de leur conservation pour des études ultérieures. Cet aspect de conservation a été pris en compte avec la constitution du Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma (depuis 2002), certifié depuis janvier 2010. Ce CRB est associé au CNR Pôle Epidémiologie et Pôle Souches. En 2010, il n'y a pas eu distribution de souches issues des collections du CNR. Les souches distribuées dans le cadre du CRB sont des souches de référence.

Description : nombre de souches, caractérisation : voir Partie C du rapport

Conditions de stockage : voir Partie C du rapport

Conditions de mise à disposition de ces collections : voir Partie C du rapport

En 2010 :

- Une technique PCR multiplex, permettant d'amplifier lors d'une seule PCR 15 marqueurs microsatellites, a été développée. Elle est appliquée à tous les prélèvements reçus au Pôle Souches.

- Le nombre de prélèvements adressés au Pôle Souches du CNR est stable par rapport à l'année précédente (187 vs 189 en 2009). Il s'agit de 105 souches et 28 ADN toxoplasmiques extraits de produits pathologiques.

Les 187 prélèvements adressés pour génotypage en 2010 correspondaient à 162 patients. Le génotypage a été possible dans 116 cas.

- En 2010, sur les 187 prélèvements reçus, 64,13% proviennent de cas de toxoplasmose congénitale, 22,45% de toxoplasmoses systémiques de patients immunodéprimés, 11,5% de cas de toxoplasmoses oculaires. Les prélèvements provenant de cas de toxoplasmoses acquises systémiques restent rares (7 prélèvements, 6 patients).

- Le génotypage confirme la prédominance du type II (88,9% des cas – chiffre stable depuis la création du CNR), l'implication du génotype Africa 1 chez des patients africains (4 cas/4), le rôle des génotypes atypiques dans des formes sévères de toxoplasmoses acquises ou congénitales (5 cas en 2010). Le type III est retrouvé chez 4 patients avec pour 2 d'entre eux une origine de contamination hors de l'Europe (Bangladesh, Côte d'Ivoire). Nous confirmons l'existence de génotypes différents dans les Antilles (*Caribbean 1*) retrouvé également chez des animaux domestiques de la zone côtière de la Guyane (travail de thèse). Un nouveau cas lié à un génotype « Amazonien » a été détecté en 2010 chez un patient hospitalisé à Bichat.

Bilan 2006-2010

- Réseau de partenaires :

- description des partenaires :

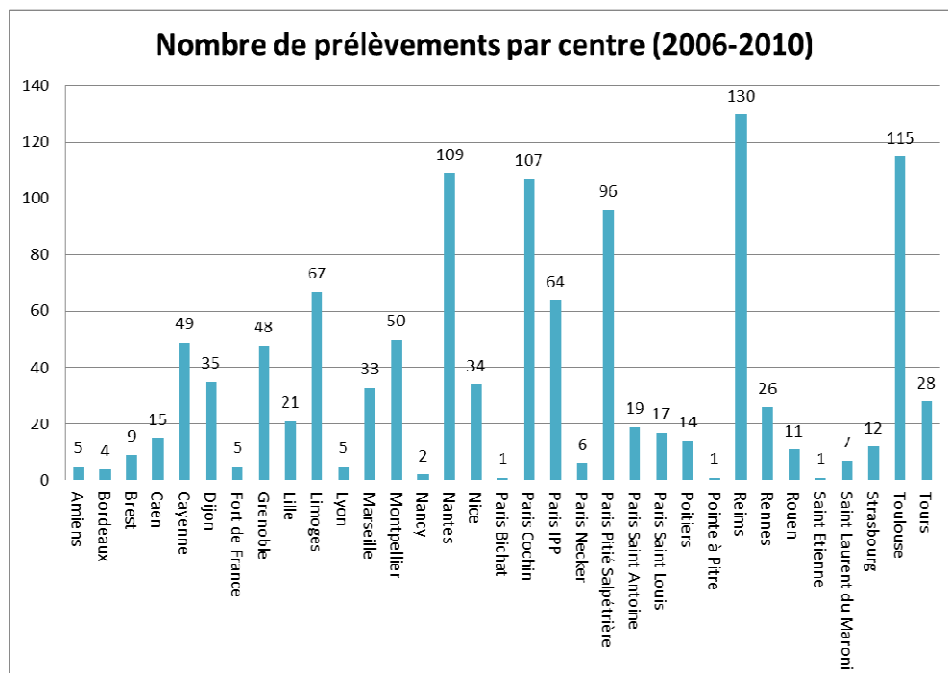


Figure 2 : Participation des partenaires du réseau à l'envoi de prélèvements au CNR Toxoplasma

Pour les laboratoires de Fort de France et de Saint Laurent du Maroni, les échantillons sont réacheminés au CNR par le laboratoire Cerba.

- répartition géographique, estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau

Trente-trois centres envoient leurs prélèvements au CNR Toxoplasma Pôle Souches. Ceci assure une bonne représentativité du territoire métropolitain et des départements français d'outre-mer (Antilles-Guyane). Certains des hôpitaux qui adressent le plus grand nombre de prélèvements reçoivent des prélèvements de divers départements français en raison de leur rôle de centre de référence. Une étude sur la réelle représentativité géographique des prélèvements et la distribution des génotypes à travers la France a fait cependant apparaître des zones peu représentées en Aquitaine et Est du Massif Central. Parmi les départements français d'outre-mer, nous ne disposons pas de données sur l'île de la Réunion (1 seule souche de cette origine isolée à Toulouse).

- Définition de l'échantillon de souches isolées

En 2010, les données du génotypage confirment celles observées les années précédentes :

- le génotype II (type II et variant) est observé chez 84,45% des 116 patients pour lesquels le génotypage a été possible, et dans 90% des cas de toxoplasmoses congénitales avec les mêmes caractéristiques que d'habitude.
- le génotype III reste rare (3,4%) : sur les 4 patients infectés par ce génotype, l'origine probable de la contamination était le Bangladesh dans un cas, la Côte d'Ivoire dans l'autre confirmant la répartition cosmopolite de ce génotype.
- Les 4 patients infectés par le génotype *Africa 1* sont tous d'origine africaine. Il s'agissait de réactivation chez des patients immunodéprimés dans 3 cas. Dans le dernier cas, il s'agissait d'une toxoplasmose congénitale sévère après séroconversion au 2^{ème} trimestre de la grossesse, après un voyage au Mali.
- Le génotype *Caribbean 1* a été retrouvé chez un patient ayant voyagé aux Antilles et en Guyane. Pour les 5 patients infectés par des génotypes atypiques, une source de l'infection hors du territoire métropolitain est soit certaine (un cas de « toxoplasmose amazonienne » acquis en Guyane Française), soit suspectée (consommation en cours de grossesse de viande de cheval importé du Brésil dans un cas ; réactivation chez un patient martiniquais dans l'autre cas). Pour les 2 autres cas, nous n'avons pas connaissance d'une épidémiologie particulière.

	Type II	Type II variant	Type III	Type II/III	Africa 1	Atypique	Caribbean 1	Non déterminé	Nombre de patients
T. congénitale	64	13	2	1	1	2	0	13	95
T. immunodéprimés	17	1	1	0	2	2	1	14	38
T. oculaire	2	0	0	0	1	0	0	18	22
T, immunocompétents	1	0	1	0	0	1	0	4	7
Pas de renseignements									
Total	84	14	4	1	4	5	1	49	162

Tableau 2: Répartition des génotypes observés dans les différentes formes cliniques en 2010.

Bilan complet des caractérisations de souches reçues en 2006-2010 :

Description

La détermination du génotype a été possible sur 901 des 1146 prélèvements adressés au CNR (souches et ADN) (78,62%). Ces prélèvements correspondent à 795 patients (794 avec renseignements cliniques).

Les génotypes de *Toxoplasma gondii*

Les premières publications reconnaissaient l'existence de 3 lignées génétiques principales de toxoplasme : Type I, II et III. L'extension du génotypage à un plus grand nombre de souches a permis de retrouver une diversité beaucoup plus importante. Mais les regroupements génétiques au sein de ces souches dites atypiques, c-a-d différentes des types I, II et III, sont encore mal définis. Les données du CNR jointe à des activités de recherche avec isolement de toxoplasmes chez des animaux de différentes régions géographiques a permis de faire émerger des regroupements au sein de ce qui était initialement appelé indifféremment « souches atypiques ». Nous avons ainsi différencié des génotypes *Africa 1* et 2 retrouvés chez une majorité des patients africains analysés au CNR, des génotypes *Caribbean 1* retrouvés chez des patients des Antilles et de la côte guyanaise. Il reste un certain nombre de souches qualifiées d'atypiques : certaines ont des caractéristiques génétiques très différentes des types classiques (cas des souches amazoniennes à l'origine des toxoplasmoses sévères du patient immunocompétent et d'autres souches isolées en France pour lesquelles l'épidémiologie est encore mystérieuse), d'autres sont caractérisées par des mélanges d'allèles classiques (Atypiques I/II, I/III, II/III). Des modifications de cette nomenclature sont à prévoir dans les années à venir.

La distribution des différents génotypes pour les 795 patients apparaît dans les tableaux suivants.

	Type II	Type III	Africa 1 et 2	Atypique	Carribbean 1	Atypique II/II	Total
Afrique	6	7	14	2	1	2	32
Amérique du Sud	0	0	0	29	0	7	36
Caraïbes	1	2	0	0	3	2	8
Europe ou non défini	656	22	12	14	1	9	714
Autre*	0	3	0	2	0	0	5
Total	663	34	26	47	5	20	795

* : Asie (1), Océan Indien (2), Nlle Calédonie (2)

Tableau 3 : Distribution des génotypes en fonction de l'origine présumée ou certaine de la contamination.

	Type II	Type III	Africa 1 et 2	Atypique	Carribbean 1	Atypique II/II	Total
T. congénitale	542	16	2	17	0	12	589
T. immunodéprimés	92	14	18	5	5	7	141
T. oculaire	25	3	6	0	0	1	35
T, immunocompétents	3	1	0	25	0	0	29
Pas de renseignements	1	0	0	0		0	1
Total	663	34	26	47	5	20	795

Tableau 4 : Distribution des génotypes en fonction de la forme clinique.

Cette distribution en fonction des formes cliniques s'explique essentiellement par le recrutement des patients et le lien entre origine géographique et génotypes :

- *les dossiers de toxoplasmose congénitale* correspondent le plus souvent à des contaminations locales, sur le territoire de résidence de la patiente. Il s'agit donc de *type II* dans 92% des cas (542/589), génotype retrouvé également dans 98% des cas chez les animaux en France métropolitaine (enquête ANSES). Dans quelques cas de génotypes atypiques, nous avons pu tracer la contamination à une source située hors de la France métropolitaine : consommation de viande importée d'Amérique du Sud (2 cas), contamination en Guyane, voyage au Brésil ou à la Réunion. Pour d'autres souches atypiques, l'enquête épidémiologique n'a pas mis en évidence de facteurs de risque particuliers.
- *Les dossiers de patients immunodéprimés* correspondent pour 54% d'entre eux à des dossiers de réactivation de toxoplasmose ancienne au cours du SIDA. Pour les patients d'origine africaine, la contamination est présumée avoir eu lieu en Afrique et les génotypes « *Africa* » retrouvés en plus forte proportion dans cette forme clinique (12,67% des dossiers de patients immunodéprimés) confirment cette hypothèse.
- *Les dossiers de patients immunocompétents* avec toxoplasmose symptomatique systémique correspondent essentiellement à des cas acquis à partir de consommation de gibier sauvage ou d'eaux de surface en Guyane amazonienne. C'est dans ces formes plus sévères que l'isolement du toxoplasme à partir du sang ou du LBA est le plus facile et le plus souvent pratiqué. Il s'agit donc dans 86.2% des cas de souches atypiques, type « *Amazonian* ». A noter cependant que, pour certaines de ces souches atypiques à l'origine de toxoplasmoses sévères, aucune source de contamination hors de la métropole n'a été trouvée. Les formes symptomatiques classiques de toxoplasmose acquise donnent peu souvent lieu à des isollements de toxoplasmes et ne sont donc pas envoyés au CNR (2 cas d'adénopathies : type II).
- *Les dossiers de toxoplasmose oculaire* comportent à la fois des cas de toxoplasmoses acquises chez des patients immunocompétents et des cas de réactivation toxoplasmique chez des patients immunodéprimés. On y observe une plus grande proportion de patients africains que dans les toxoplasmoses congénitales.
- A noter que nous n'avons reçu *aucune souche de type I*. Ce génotype est considéré dans la littérature comme une lignée majeure en Europe et Amérique du Nord, virulente pour la souris. Son dernier isolement en France remonte aux années 1990. Par ailleurs, un génotypage multilocus plus précis a permis de reclasser des souches identifiées initialement comme type I dans d'autres génotypes (notamment *Africa 1*).

L'enquête épidémiologique sur les sources de contamination doit être renforcée, notamment en cas d'isolement de souches différentes du type II pour mieux comprendre l'origine de leur circulation chez des patients en France : voyage, aliment importé ou rares souches autochtones atypiques dans l'environnement en France.

Relation sévérité clinique et génotypes

L'envoi au CNR des données cliniques permet d'analyser les liens éventuels entre génotypes et sévérité de l'infection, dans chaque catégorie de formes cliniques.

1. *Toxoplasmoses congénitales*

Le génotypage de la souche a été possible pour 591 cas de toxoplasmose congénitale. Pour 540 d'entre eux, des données cliniques ont été obtenus à la naissance.

	Type II	Type III	Africa 1 et 2	Atypique	Caribbean 1	Atypique I/II/III	Total
Asymptomatique	368	13	0	4	0	4	389
Calcifications cérébrales, rétinoblastome	56	0	0	4	0	0	60
Dilatations ventriculaires, formes disséminées	74	0	2	9	0	4	89
Autres*	2	0	0	0	0	0	2
Pas de données	44	3	0	0	0	4	51
Total	544	16	2	17	0	12	591

* : morts fœtales d'autres étiologies

Tableau 5 : Génotypes observés dans les 591 cas de toxoplasmoses congénitales, en fonction de la gravité de l'atteinte clinique.

Les formes sévères (dilatations ventriculaires, formes disséminées fœtales ou néonatales, mort fœtale in utero) concernent 14,68% des souches de type II (74/504), 0% des souches des 13 souches de type III, mais 52,94% (9/17) et 50% (4/8) respectivement des souches atypiques et atypiques I/II/III. Malgré les chiffres encore faibles de ces deux dernières catégories, la différence est significative.

Cette analyse peut être renforcée par l'examen de la période gestationnelle de la séroconversion maternelle, facteur majeur du pronostic :

- Pour le type II, les formes sévères sont observées dans 63% des cas après infection au cours du 1^{er} trimestre, dans 24,61% après des infections du 2^{ème} trimestre et 10,76% après des infections du 3^{ème} trimestre,
- Pour les souches atypiques, ces proportions s'inversent : les formes sévères sont observées dans 57% des cas après infection maternelle au 3^{ème} trimestre, 28% au 2^{ème} trimestre et 14,28% au 1^{er} trimestre.
- Pour les souches atypiques I/II/III, les 4 formes sévères correspondent à des infections du 2^{ème} trimestre.

Nous avons par ailleurs pu montrer la possibilité de réinfection par une souche atypique chez une femme précédemment immunisée, suivie d'une transmission congénitale.

Ces données sur la gravité potentielle des souches différentes des types II et III devraient inciter à un renforcement de la surveillance de la toxoplasmose congénitale dans les départements français d'Amérique.

La distinction entre les souches responsables de toxoplasmoses asymptomatiques et celles à l'origine de rétinoblastome est plus difficile à faire en raison de la possibilité d'apparition tardive des atteintes oculaires. Nous essaierons d'obtenir dans au moins 50% des dossiers un suivi à 5 ans de ces enfants afin de voir si un lien peut exister entre souche et apparition de rétinoblastome.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. J Infect Dis. 2009 Jan 15;199(2):280-285.

Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Dardé ML, Dei-Cas E, Houfflin-Debarge V. Severe congenital toxoplasmosis due to a Toxoplasma gondii strain with an atypical genotype: case report and review. Prenat Diagn. 2010 Sep;30(9):902-5. Review.

2. Toxoplasmoses du patient immunodéprimé (hors toxoplasmose oculaire)

135 patients immunodéprimés (74 VIH, 61 non VIH) présentant des toxoplasmoses systémiques (cérébrales ou extra-cérébrales) ont été analysés. L'analyse sur 88 de ces patients a montré que, si l'on considérait d'une part les cas dus au génotype II, d'autre part ceux à des génotypes non II, il n'y avait d'influence du génotype ni sur la forme clinique ni sur l'évolution de l'infection (Ajzenberg et al. 2009). Seule l'origine géographique des patients était significativement associée à la distribution des génotypes. Même si le nombre des patients a augmenté depuis cette publication, cette conclusion reste d'actualité. Il semble que, pour ce parasite opportuniste, l'état immunitaire ait un rôle prépondérant par rapport à la souche parasitaire. Néanmoins, l'analyse pourra être affinée lorsque nous aurons une meilleure définition des génotypes non II et un plus grand nombre de patients infectés par ces génotypes.

	Type II	Type III	Africa 1 et 2	Atypique	Carribbean 1	Atypique II/III	Total
VIH	41	11	16	0	0	6	74
Non VIH	51	3	2	4	0	1	61
Total	92	14	18	4	0	7	135

Tableau 6 : Génotypes observés chez les patients immunodéprimés, en fonction de la pathologie sous-jacente.

Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, Aubert D, Franck J, Bessières MH, Quinio D, Pelloux H, Delhaes L, Desbois N, Thulliez P, Robert-Gangneux F, Kauffman-Lacroix C, Pujol S, Rabodonirina M, Bougnoux M-E, Cuisenier B, Duhamel C, Duong T-H, Filisetti D, Flori P, Gay-Andrieux F, Pratloug F, Nevez G, Totet A, Carme B, Dardé ML, Villena I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis.* 2009 Apr 15;199(8):1155-1167.

3. Toxoplasmoses du patient immunocompétent (hors toxoplasmose oculaire)

L'isolement à partir de cas de toxoplasmose acquise chez des patients immunocompétents reste rare (29 patients).

Dans 25 cas, il s'agit des formes multiviscérales de toxoplasmose avec une expression pulmonaire prédominante. Elles sont toujours dues à des souches très atypiques. Dans 22 cas, elles ont été acquises à partir de gibier ou d'eaux en forêt amazonienne. Dans 1 cas, elle a pu être rapportée à la consommation de viande importée du continent américain. Pour 2 cas diagnostiqués sur le territoire métropolitain, nous n'avons pas retrouvé de facteurs de risques épidémiologiques particuliers. Il est possible que ces formes encore mal connues du corps médical en dehors de la Guyane soient sous diagnostiquées en France.

A noter 2 atteintes cérébrales chez des patients sans immunodéficit connu, dont l'une possiblement acquise au Bangladesh. Ceci est à rapprocher des cas de toxoplasmose cérébrale décrits dans la littérature chez des patients indiens.

	Type II	Type III	Africa 1 et 2	Atypique	Carribbean 1	Atypique II/III	Total
Forme multiviscérale	0	0	0	25	0	0	25
Adénopathies	2	0	0	0	0	0	2
Atteinte cérébrale	1	1	0	0	0	0	2
Total	3	1	0	25	0	0	29

Tableau 7 : Génotypes observés dans les cas de toxoplasmose acquise du patient immunocompétent.

De Salvador-Guillouët F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, Saint-Paul MC, Dunais B, Dellamonica P, Marty P. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. *J Infect.* 2006 Aug;53(2):e47-50.

Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis.* 2007 Oct 1;45(7):e88-95.

4. Toxoplasmoses oculaires

En raison de la très faible quantité d'ADN toxoplasmique présent dans les prélèvements d'humeur aqueuse ou de vitré, nous ne disposons du génotypage parasitaire que pour 35 patients.

La prédominance du type II même chez des patients immunocompétents confirme que ce génotype prédominant dans l'environnement en France peut aussi être à l'origine d'atteintes oculaires acquises. L'absence de génotypes atypiques divers ou de Carribbean 1 n'est certainement que le reflet d'un biais

de recrutement. Connaissant la grande fréquence des toxoplasmoses oculaires dans certaines zones du Brésil, des enquêtes sur les toxoplasmoses oculaires dans les départements français d'Amérique seraient à envisager.

Etat immunitaire	Type II	Type III	Africa 1 et 2	Atypique	Carribbean 1	Atypique II/III	Total
Immunocompétent	9	2	3	0	0	1	15
Immunodéprimé	11	1	1	0	0	0	13
Non renseigné	5	0	2	0	0	0	7
Total	25	3	6	0	0	1	35

Tableau 8 : Génotypes observés dans 35 cas de toxoplasmose oculaire, en fonction de l'état immunitaire.

Analyse de la chimiosensibilité :

L'analyse de 17 souches de la collection représentatives des différents génotypes a été réalisée vis-à-vis de la pyriméthamine, la sulfadiazine, et l'atovaquone en 2007. Les résultats ont montré une faible variation de sensibilité du toxoplasme à la pyriméthamine et à l'atovaquone, sans réelle chimiorésistance. Une plus grande variabilité de sensibilité a été mise en évidence pour la sulfadiazine, avec une possibilité de résistance pour 3 souches. Il n'a pas été trouvé de relation entre la chimiosensibilité, la présence de mutations sur les gènes cibles (DHFR, DHPS) et le génotype parasitaire. Cette analyse de chimiosensibilité devra s'étendre à l'ensemble des souches isolées par développement d'une technique de screening rapide de la sensibilité.

Les souches reçues par le CNR dans le courant de l'année 2008 et 2009 n'ont pas été étudiées car le test mis en place initialement par le Pr Derouin (Laboratoire Support du Pôle Souches) a été arrêté du fait de la lourdeur du test (culture sur cellule MRC5, test de 10 concentrations et quantification par ELISA, difficile à appliquer en routine) et d'un changement thématique de ce laboratoire. Un test simplifié de mesure de la chimiosensibilité devait être proposé par le Laboratoire Coordonnateur (D Aubert impliqué dans le Pôle Souches). Des tests sur différents modèles cellulaires ont été réalisés.

En 2010, le Laboratoire Coordonnateur a mis au point une nouvelle méthode d'évaluation de la sensibilité des souches en changeant de modèle cellulaire (cellules VERO). Cette méthode est en cours d'évaluation sur plusieurs souches afin de déterminer les CI50 attendues. Parallèlement des techniques de mesure d'efflux de sonde (rhodamine et/ou calcéine-AM en présence ou non d'inhibiteurs) en cytométrie en flux ont été développées pour repérer les souches avec efflux accru signant une potentielle résistance aux drogues testées (mécanisme passant par les ABC transporteurs de *T. gondii* décrits par l'équipe de Reims).

D-1.2 Techniques et expertise sérologique

Activité 2006-2009

Un des objectifs du Pôle Sérologie est de contribuer à l'évaluation des techniques de diagnostic immunologiques permettant un diagnostic précoce de l'infection dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

Pour atteindre cet objectif, nous avons constitué depuis 2006, avec la participation des membres du réseau, une biothèque évaluative comprenant 3 panels de sérums qualifiés préalablement par des techniques de référence:

Biothèque :

Panel 1 : permettant l'estimation de la sensibilité et de la spécificité des IgG et des IgM toxoplasmiques et comprenant :

- 200 sérums avec des IgG négatives et des IgM négatives permettant d'estimer la spécificité IgG et IgM et 70 sérums « d'autres pathologies » virales, bactériennes et d'immunitaires présentant une pathologie potentiellement interférente et négatifs en IgG et IgM toxoplasmique par les techniques de référence.
- 200 sérums avec des IgG positives et des IgM négatives permettant d'estimer la sensibilité des IgG
- 100 sérums avec des IgG positives et des IgM positives permettant d'estimer la sensibilité des IgM

Panel 2 : destiné à analyser la détectabilité et la spécificité des techniques comporte 30 sérums avec des « taux limite » présentant des IgG proches du seuil de positivité par l'une des techniques employées et des IgG positives ou négatives par une autre technique.

Panel 3 : destiné à évaluer les techniques de diagnostic précoce avec datation d'une séroconversion toxoplasmique comporte 100 sérums issus de 30 dossiers de séroconversions et 100 sérums de toxoplasmoses chroniques caractérisés par la présence d'IgG positives et/ou des IgM positives avec un sérum ayant une antériorité positive de plus d'un an.

Le groupe de travail du Pôle Sérologie a défini les réactifs à évaluer, les laboratoires en charge des évaluations ainsi que les modalités d'évaluation de ces réactifs.

Le choix des réactifs a été arrêté après une enquête préalable réalisée en 2007 auprès des membres du réseau. Les premiers réactifs qui ont été analysés concernaient 6 techniques d'agglutination, directe ou indirecte, de dépistage rapide avec un marquage CE.

<i>Réactif</i>	<i>Fabricant</i>	<i>Laboratoire</i>
Toxolates [®] (L)	Fumouze	CHU Angers
Pastorex Toxo [®] (L)	BioRad	CHU Angers
Toxocell Latex [®] (L)	Biokit	CHU Bichat Paris
Toxo HAI [®] (HA)	Fumouze	CHU Timone Marseille
Cellognost ToxoplasmoseH [®] (HA)	Siemens	CHU Timone Marseille
Toxoscreen [®] (T)	BioMérieux	CHU Bichat Paris

L'analyse des performances globales des réactifs pour les réactifs d'hémagglutination indirecte (HA) (HAI[®]Fumouze et Cellognost[®]Siemens) ou d'agglutination directe de toxoplasmes entiers (T) (Toxoscreen[®]BioMérieux) ont montré une sensibilité de 100% et des spécificités (99.2% pour les techniques d'hémagglutination et 98.8% pour la technique d'agglutination directe de toxoplasmes entiers (T).

Pour les réactifs d'agglutination indirecte de particules de latex (L), le réactif Pastorex[®]BioRad, a une sensibilité et une spécificité de 98.8%. Les sensibilités des 2 derniers réactifs : Toxolates[®] Fumouze et Toxocell[®]Biokit sont respectivement de 93.7% et 96.8% avec des spécificités de 97.1% et 97.6%.

L'analyse de la détectabilité des taux limites d'IgG en absence d'IgM montre une sensibilité de 97% avec les réactifs d'hémagglutination. Cette sensibilité est moindre avec les autres réactifs : Toxoscreen (84.8%), Toxocell (66.7%), Toxolates et Pastorex (51.5%).

Les résultats des performances des réactifs sur les sérums de toxoplasmoses aiguës ont montré une sensibilité de détection de 100% pour les réactifs Toxolates et Toxoscreen et de 90.9% pour les réactifs

Toxocell et Pastorex. Enfin pour les réactifs Toxo HAI et Cellognost les sensibilités sont respectivement de 90.2% et 81.8%.

L'ensemble des résultats de ces expertises, ont été publiés au cours de l'année 2011.

Contribuer à la standardisation des techniques de diagnostic immunologiques permettant un diagnostic précoce de l'infection dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose congénitale :

Une enquête sur les pratiques de diagnostic sérologique de la toxoplasmose a été menée auprès des laboratoires réseau du CNR. Les résultats mettent en évidence l'hétérogénéité des techniques mises en œuvre dans les centres universitaires.

Pour la détermination des IgG toxoplasmiques, 12 techniques différentes sont utilisées et 75% des laboratoires mettent en place 2 techniques ou plus. Pour la détermination des IgM toxoplasmiques, 11 techniques différentes sont utilisées et 86% des laboratoires mettent en place 2 techniques ou plus. La technique ISAGA IgM est utilisée dans 96% des laboratoires en tant que deuxième technique ou technique de confirmation. Une détermination des IgA toxoplasmiques est réalisée par 32% des laboratoires.

Une liste des laboratoires experts pour le diagnostic de la toxoplasmose mentionnant les correspondants médicaux et les spécificités techniques proposées par ces laboratoires a été créée et mise à disposition des professionnels sur le site du CNR.

Apporter une aide aux professionnels de santé dans le diagnostic et la prise en charge des femmes enceintes, des nouveau-nés et des immunodéprimés vis à vis du risque de la toxoplasmose par :

Le groupe de travail en collaboration étroite avec les membres du réseau a rédigé un guide d'interprétation consensuel des sérologies toxoplasmiques destiné à l'ensemble des biologistes ayant en charge le diagnostic immunologique de la toxoplasmose. Ce guide sous forme de logigrammes a été publié et mis en ligne sur le site du CNR Toxoplasmose.

Une enquête a été menée au sein du réseau du CNR portant sur les séroconversions toxoplasmiques sans IgM ou avec des IgM fugaces afin d'évaluer la fréquence de ces dossiers et d'en informer par le biais d'une publication à venir les biologistes et cliniciens en charge du dépistage des séroconversions toxoplasmiques notamment dans le cadre d'une grossesse.

La datation de la contamination lors d'une séroconversion est primordiale pour l'évaluation du risque fœtal et la prise en charge thérapeutique. La technique d'avidité des IgG est un des éléments permettant de préciser l'ancienneté de l'infection pour des sérologies associant des IgG et des IgM positives. Une enquête a été initiée auprès des laboratoires du réseau et les résultats préliminaires ont montré que dans 55% des sérologies avec IgG et IgM positives, l'avidité des IgG toxoplasmiques a permis de conclure à une infection de plus de 4 mois.

Les résultats de ces enquêtes ont été diffusés aux membres du groupe de travail du CNR et seront discutés lors des réunions annuelles, permettant un échange sur les pratiques et la validation des propositions du Laboratoire Associé Pôle Sérologie.

Participation à l'amélioration et à l'harmonisation de la prise en charge des sérologies toxoplasmiques :

Le groupe de travail travaille à l'harmonisation des modalités de prise en charge des sérologies par le biais de questionnaires, adressés aux membres du réseau, qui ont permis de faire une synthèse des pratiques et qui ont servi de base à l'élaboration de propositions de prise en charge consensuelles (i) d'un sérum présentant des discordances techniques (ii) du diagnostic sérologique d'une toxoplasmose congénitale (iii) d'une chorioretinite toxoplasmique et (iv) du dépistage et suivi sérologique du sujet immunodéprimé.

Ces différentes modalités de prise en charge seront discutées lors des réunions annuelles et feront l'objet de publications notamment sur le site du CNR.

Un travail de fond a été réalisé en 2009 pour la DHOS concernant les cotations des actes de biologie hors-nomenclature en toxoplasmose. Tous les aspects du diagnostic ont été considérés (sérologique, moléculaire, inoculation à la souris). Par ailleurs, un travail est en cours avec les représentants de la commission de la nomenclature pour réviser la nomenclature des actes de biologie concernant la toxoplasmose. Plusieurs membres du CNR se sont particulièrement impliqués dans ces deux missions dont les responsables des différents Pôles d'activités. La nomenclature de la toxoplasmose a été revue essentiellement en termes de tarification (à la baisse) en 2010 et un nouveau travail est en cours en 2011 pour établir la liste des analyses à conserver ou introduire pour assurer le diagnostic de la toxoplasmose.

En 2010 :

Le groupe de travail a évalué les quatre trousse d'avidité des IgG commercialisées (marquage CE) sur un panel de sérum comportant au total 208 sérums répartis comme suit :

- groupe 1 : 69 sérums provenant de toxoplasmoses évolutives dont 52 seulement présentent des IgG détectables avec les 4 réactifs. Les 17 restants ont des IgG positives ou non selon les trousse (début de séroconversion).
- groupe 2 : 84 sérums de toxoplasmoses chroniques dont :
 - 50 sérums avec des IgG < 50 UI/mL associées à des IgM négatives dont 9 sérums provenant de sujets immunodéprimés
 - 34 sérums de toxoplasmoses chroniques de plus de 1 an avec des IgM négatives dont 11 provenant de patients immunodéprimés
- groupe 3 : 46 sérums de toxoplasmoses chroniques de plus de 1 an avec des IgM résiduelles dont 3 provenant de sujets immunodéprimés.

Les réactifs expertisés sur automate sont:

- avidité IgG BioMérieux sur automate Vidas
- avidité IgG Diasorin sur automate Liaison
- avidité IgG Abbott sur automate Architect
- avidité IgG BioRad sur automate Evolis

Les résultats sont en cours de publication.

- La constitution de nouveaux se poursuit et permettra d'évaluer les prochains réactifs.

- Une enquête sur les séroconversions toxoplasmiques sans IgM ou avec des IgM fugaces a été lancée au sein du réseau du CNR afin d'évaluer la fréquence de ces dossiers et de les regrouper en vue d'une publication.

D-1.3 Techniques et Expertise en Biologie moléculaire

Durant toute cette période, l'activité du Pôle Biologie Moléculaire a été principalement concentrée autour de l'**évaluation des méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose**, avec pour objectif majeur la "**standardisation**" du **diagnostic moléculaire** en France. En effet, en dehors des méthodes d'extraction d'ADN (qui sont aujourd'hui quasiment partout commerciales), il n'existait à l'époque quasiment aucune méthode de PCR-Toxoplasmose commercialisées (trousse). De plus, la plupart de ces trousse sont apparues en retard sur un plan technologique par rapport aux méthodes développées dans les CHU. Il en résulte que les méthodes de PCR étaient et sont toujours "artisanales" ("maison") dans tous les centres spécialisés dans ce diagnostic en France, ce qui entraîne nécessairement des variations d'efficacité, et de performances.

De 2006 à 2008, l'objectif défini au niveau du groupe de travail était de tenter d'homogénéiser, voire de standardiser, ces méthodes de PCR "maison" extrêmement diversifiées réalisées dans les différents CHU. A partir de 2008, l'objectif de "standardisation" des méthodes a fait place, de façon plus pragmatique, à celui d'**homogénéisation des "performances"** des différentes méthodes, ceci en proposant des seuils de détection minimum qui devraient être atteints par les laboratoires.

L'objectif d'évaluer et classer les différentes méthodes de diagnostic moléculaire utilisées dans les Laboratoires-Supports a été atteint ; toutefois, la détermination de seuils de détection minimum n'a pas encore fait l'objet d'un consensus. Un seuil "minimal" de sensibilité a été effectivement défini au sein du GdT, mais, pour des raisons techniques, en parasites par prise d'essai et non en parasites par mL. Ce

seuil sera re-travaillé en 2011-2012 grâce à des contrôles de qualité externes beaucoup plus fins (voir projet).

Les différents acquis du bilan de ce Laboratoire-Associé sont résumés ci-dessous :

1. Création et structuration du groupe de travail (GdT)

Le début de l'activité a été marqué par la mise en place de la structuration du GdT du Pôle en 8 laboratoires. En dehors de Montpellier, il est constitué de 7 Laboratoires-Supports, tous situés en C.H.U. (Dijon, Grenoble, Lille, Paris-Cochin, Paris-Pitié, Strasbourg, Toulouse). Ce choix d'un GdT élargi a contribué de façon importante à la prise en compte, dans les études, de la diversité des méthodes utilisées en France.

Les membres du groupe se sont réunis une, puis deux, puis trois fois par an, ce qui a permis d'augmenter les échanges au sein du groupe, et d'instaurer un climat de confiance et de transparence entre les participants. Ces échanges ont fait naître une dynamique et une forte stimulation pour la réalisation des objectifs que le GdT s'était fixés.

2. Elaboration d'un matériel biologique de référence

Depuis 2006, le Pôle a eu parmi ses objectifs prioritaires de pouvoir disposer d'un matériel biologique de référence, dit "étalon", discriminant, robuste, reproductible, et produit en grande quantité de façon à ce que tout laboratoire (en premier lieu les laboratoires du GdT) puisse en disposer pour tester et valider des méthodes de PCR-toxoplasmose sur une base commune.

En 2006 et 2007, plusieurs essais ont été conduits (i) d'une part, sur du liquide amniotique de vache : de nombreuses difficultés techniques sont apparues, faisant peu à peu abandonner cette piste (ii) d'autre part, des essais de lyophilisation conduits dans les laboratoires de Montpellier et Strasbourg se sont révélés peu concluants.

En 2008, le Pôle s'est focalisé sur cet objectif qui a été en grande partie atteint, avec la confection d'échantillons lyophilisés, mimant les échantillons cliniques et élaborés à diverses concentrations de Toxoplasmes. La lyophilisation de ce matériel a fait l'objet de nombreuses mises au point et été finalement réalisée en collaboration avec un industriel (entreprise Lyofal à Salon de Provence). Des études réalisées à Montpellier ont montré que la perte d'ADN parasite était négligeable, même à de très basses concentrations (plus discriminantes pour tester les performances des laboratoires).

Un net progrès a été enregistré en 2009 avec l'utilisation de Toxoplasmes provenant de cultures *in vitro* permettant une estimation précise des concentrations préparées. Dès lors, des quantités importantes de ce matériel "étalon" ont pu être préparées, et des échantillons "étalon" lyophilisés de 10 toxoplasmes/mL accompagnés de leurs protocoles d'utilisation au groupe de travail.

En 2010, la production de ce matériel "étalon" a été affinée et diversifiée :

(i) Les faibles concentrations (5 et 10 toxoplasmes/mL) ont continué à être envoyées pour le Contrôle de Qualité national, mais avec un nombre de tubes adapté aux chances de détection à ces concentrations (prise en compte de la loi de Poisson) ;

(ii) Des échantillons à diverses concentrations (10 à 10^5 toxoplasmes/mL) ont été fournis en vue d'une auto-évaluation par les Laboratoires-Supports des performances de leurs propres méthodes. Ce matériel était accompagné d'un guide de réalisation pratique et de conseils destinés à augmenter l'efficacité de la méthode; il permet de réaliser dans chaque centre une gamme de dilutions et/ou un calibrateur pouvant être utilisé au cours des analyses de routine. Ces envois continueront à être adressés de façon indépendante dans le temps afin de permettre à chacun de disposer à tout moment d'une gamme de calibration commune (voir chapitre Quantification).

(iii) Ce même type de matériel est fondamental dans l'approche d'homogénéisation des pratiques de quantification, seule condition pour pouvoir réaliser et surtout interpréter des études multicentriques au sujet de la charge parasite ; dans le cadre du CQ national, des échantillons à 30, 50 et 150 toxoplasmes/mL ont été envoyés en complément des faibles concentrations précédemment citées.

3. Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose

L'organisation du Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose, qui avait été initié en 2002 par le Laboratoire Associé sous l'égide d'ANOFEL, a été reprise dès 2006 sous l'égide du CNR, qui s'est donc trouvé vivement impliqué dans ce domaine. Ce CQ concerne exclusivement le diagnostic prénatal (excluant pour l'instant le travail sur le sang et le placenta, moins courants et techniquement beaucoup plus difficiles à évaluer). Il reste basé sur une participation volontaire,

anonyme et gratuite. L'ensemble des éditions 2006-2010 a été suivi par 28 à 29 participants représentant l'ensemble des laboratoires de CHU possédant l'agrément pour le DPN de la toxoplasmose (mais aucun laboratoire privé).

La mise en place du Contrôle de Qualité national en PCR-Toxoplasmose et les contacts qui s'en sont suivis ont grandement contribué à l'objectif de "décloisonnement" au niveau national dans le domaine de ce diagnostic. En ce sens, un esprit d'ouverture, d'auto-évaluation et de sens critique s'est imposé dans la majorité des centres pratiquant ce diagnostic spécialisé. A chaque CQ, un rapport a été rédigé, mentionnant des pistes d'amélioration des pratiques et des méthodes pour ce diagnostic. Les conseils inclus dans le rapport ont probablement contribué à l'amélioration globale de ce diagnostic, objectif majeur affiché en début de mandat quinquennal.

En termes de méthodes, des progrès considérables ont été accomplis en 5 ans, avec une véritable "semi-professionnalisation" de l'ensemble du processus, en parallèle avec les progrès sur le matériel "étalon" décrits plus haut. Durant la période 2006-2009, les CQs étaient basés sur l'envoi de 5 échantillons tous préparés en liquide amniotique (deux négatifs et trois positifs constitués par des gammes de concentrations basses de Toxoplasmes). En terme de résultats, ces différents CQ ont montré une très bonne sensibilité de la méthode pour l'énorme majorité des laboratoires impliqués dans ce diagnostic, avec un seuil inférieur à 10 toxoplasmes par mL de liquide amniotique pour 27 des 29 centres participants entre 2006 et 2008 et le rendu positif par l'ensemble des laboratoires d'au moins un des deux échantillons adressés à la concentration de 5 Toxoplasmes par mL en 2009. Il faut souligner que, pour durant ces quatre années consécutives, aucun faux positif n'a été relevé. Par ailleurs, en terme de quantification absolue les résultats ont clairement mis en évidence le problème de la fiabilité du dosage par PCR en temps réel, avec une forte variabilité inter-laboratoires et, malgré le nombre croissant de centres réalisant cette quantification, seuls un petit nombre d'entre eux, ont rendu des résultats relativement fiables et en adéquation avec les concentrations attendues. Ces données confirment donc bien le besoin d'une méthode de quantification standardisée et d'une gamme identiques pour tous.

L'année 2010 a également vu naître une collaboration entre le CHRU de Montpellier et Quality Control for Molecular Diagnosis (QCMD, Glasgow, UK) ; cette entreprise privée, qui réalise des contrôles de qualité pour le diagnostic moléculaire de nombreux microorganismes, s'est en effet heurtée à des difficultés nécessitant un support scientifique expert. Elle a contacté le LA afin d'envisager que nous partagions notre savoir-faire en matière de promoteur de Contrôle de Qualité en nous proposant une collaboration au niveau européen (150 centres participants). Celle-ci devrait être poursuivie au vu des résultats fructueux.

4. Eudes comparatives multicentriques

Toute tentative d'homogénéisation des méthodes de diagnostic à un niveau national nécessitait deux étapes préalables : l'évaluation comparée des méthodes utilisées par tous les membres du GdT, et l'homogénéisation des "performances" au sein de ce groupe. Plusieurs études multicentriques ont donc été réalisées depuis 2006, afin de satisfaire à ces exigences. Les différences apparaissent surtout dans de faibles concentrations de toxoplasmes (< 10 parasites par mL), il est primordial de tester ces faibles concentrations dans les études comparatives car près de la moitié des liquides amniotiques infectés ont été rapportés avec des charges parasitaires inférieures à 10 / mL (Costa et al., *Prenat Diagn.* 2001).

Trois études comparatives multicentriques ont ainsi été menées **en 2006 et 2007**, avec deux objectifs différents : d'une part, évaluer et classer les différentes méthodes de diagnostic moléculaire utilisées dans les laboratoires impliqués dans le Pôle; d'autre part, évaluer et comparer cinq méthodes commerciales d'extraction de l'ADN pour ce diagnostic moléculaire.

Ces études ont été réalisées avec le souci constant d'éliminer au maximum les multiples biais et causes de variations qui peuvent entrer en jeu dans les méthodes moléculaires et ne sont pas directement en rapport avec l'objet étudié. Cette mission, bien qu'indispensable, s'est avérée très délicate lorsqu'on connaît l'intrication étroite des différentes étapes, soit pré-analytiques soit intrinsèques au diagnostic moléculaire. De fait, ont été ainsi mises en évidence les incertitudes liées intrinsèquement à ce type d'étude, où le facteur "PCR" est fortement intriqué avec les facteurs "pratiques pré- et para-analytiques" (transport de l'échantillon, standardisation de la préparation des échantillons-tests, extraction d'ADN,

nature de la cible, amorces, optimisation des conditions de PCR, présence/abs de témoin interne, présence/absence d'UNG et peut-être technologie utilisée pour la PCR en temps réel....).

Néanmoins, malgré la complexité de l'analyse des résultats, ces études ont permis de dégager des méthodes plus "performantes" et d'autres moins même si l'homogénéisation n'a pas été atteinte. Elles ont surtout donné lieu à des recommandations concernant l'extraction d'ADN (publiées), la cible ADN utilisée (publiées), et l'optimisation des conditions de la méthode de PCR (au sein du groupe de travail pour l'instant) toutefois.

Ces études ont fait l'objet de deux publications dans des revues internationales (Yera et al., *J. Clin. Microbiol.* 2009; Sterkers et al., *J. Clin. Microbiol.* 2010).

Trois études multicentriques ont également été réalisées en 2009 :

- Une **étude comparative de trois méthodes de PCR** a été réalisée au sein des LS de Paris-Cochin et Lille. Cette étude a confirmé la supériorité de la cible ADN préalable recommandée par le GdT (cf *supra*). Par contre, deux appareils différents utilisant deux technologies de détection différentes ont donné une sensibilité similaire, ce qui est rassurant.

- Une étude plus ciblée, **visant les très faibles concentrations en Toxoplasmes** (1 et 2,5 toxoplasmes par ml) a été réalisée au sein du Pôle BM. Cette étude très "stringente" a révélé de fortes différences entre centres; mais ces différences ne peuvent pas être expliquées simplement par la méthode de PCR utilisée ni par la distribution statistique. Des travaux complémentaires doivent être réalisés afin de déterminer l'importance de l'adéquation entre méthode d'extraction d'ADN et méthode de PCR utilisée.

- Par ailleurs, une **évaluation d'une trousse commerciale de PCR-Toxoplasmose** a été réalisée au CHRU de Montpellier (avec la participation des CHU de Grenoble et Toulouse) en comparaison avec deux techniques maison utilisant la même cible ADN. Les résultats sont fortement en défaveur de l'utilisation de ce kit laissant passer 7 diagnostics de toxoplasmose congénitale (faux négatifs) sur 15, en accord avec les évaluations de sensibilité analytique des trois méthodes. Les résultats de cette étude doivent faire l'objet d'une publication (Morelle et al.).

Une étude reposant sur une **méthode diagnostique innovante** à également été initiée en 2009 : le LS de Paris-Pitié a démarré un travail sur l'intérêt de la spectrométrie de masse pour le diagnostic de la toxoplasmose oculaire. Ce travail a été poursuivi en 2010 et est actuellement en cours.

En 2010 : Une **autre évaluation de trousse commerciale** a été réalisée toujours en comparaison avec des méthodes "maison" et toujours de manière multicentrique. Les résultats des tests de ce kit sont en cours de publication.

5. Participation à la "standardisation" du diagnostic moléculaire

Ceci était l'un des objectifs majeurs de ce LA mais aussi certainement le plus ambitieux. Les points abordés précédemment participent tous de cet objectif.

De façon pragmatique, devant l'extrême diversité des méthodes constatées par ses enquêtes, et en lien avec son objectif d'"homogénéisation des performances", le Pôle "Biologie Moléculaire" a cherché à définir des seuils minimum de sensibilité à atteindre, qui pourraient être proposés comme "standard" aux laboratoires concernés par ce diagnostic. Les études multicentriques réalisées au sein du GdT en 2009-2010 (cf. *supra*) ont permis d'établir un seuil "consensus" à 0,5 toxoplasmes par prise d'essai de PCR.

En 2010 : Une étude multicentrique a été réalisée en ce sens.

Un flacon de toxoplasmes lyophilisés à partir d'une concentration de 10^5 toxoplasmes par mL, accompagné d'un protocole d'utilisation a été distribué aux laboratoires du GdT de façon à ce que chaque laboratoire puisse établir à partir d'un matériel étalon standardisé (i) une **gamme standard de calibration** en 7 points qui permet d'avancer pour chaque LS sur l'adéquation entre méthode d'extraction d'ADN et méthode de PCR utilisée; (ii) un **calibrateur standardisé à 10 toxoplasmes par mL** qui pourra être utilisé de façon à quantifier chacune des gammes utilisées dans le laboratoire et, en définitive, à s'en servir comme gamme unique (ou point de gamme unique pour ceux qui utilisent une technologie qui le permet). Cette étude révèle que tous les laboratoires du GdT détectent jusqu'à 1 toxoplasme par prise d'essai (correspondant à 10 toxoplasmes par mL) de façon constante; 6 laboratoires sur 8 détectent 0,1 toxoplasmes par mL dans au moins 1 puits sur 3. Un seuil minimum de sensibilité a ainsi été fixé à 0,5 toxoplasmes par prise d'essai pour l'ensemble des LS.

6. Participation à la standardisation de la quantification par PCR en temps réel

Le Contrôle de Qualité national en DPN de la toxoplasmose a clairement mis en évidence un manque de cohérence entre CHU dans la quantification de la concentration en toxoplasmes dans le liquide amniotique. Or, bien que ce fait soit encore controversé, la charge parasitaire a été rapportée comme pouvant renseigner sur le pronostic fœtal et pourrait à ce titre être réclamée par les cliniciens en charge de la toxoplasmose congénitale. Homogénéiser la quantification par PCR sur le plan national est un vaste chantier. Notre objectif est de réaliser des études ponctuelles afin de proposer des éléments scientifiques précis pour valider telle ou telle façon de procéder pour cette quantification.

En 2010 : Une étude multicentrique au sein du Pôle BM est actuellement en cours ; elle a deux objectifs :

(i) déterminer le type de **calibrateur externe** à choisir pour standardiser la gamme de quantification (point à 10 toxoplasmes par mL obtenu à partir de l'extraction d'une concentration élevée en toxoplasmes ou extrait directement de cette concentration). Les premiers résultats indiquent les deux calibrateurs sont équivalents.

(ii) choisir une concentration optimale pour ce calibrateur; dans la mesure où l'ensemble des centres détectent toujours 10 toxoplasmes par mL dans 100% des puits testés et dans la mesure où près de la moitié des liquides amniotiques infectés ont été rapportés avec des charges parasitaires inférieures à 10 / mL (Costa et al., *Prenat Diagn.* 2001), le choix de cette concentration en calibrateur nous semble approprié.

Un point essentiel à la validation de la quantification par PCR en temps réel est la stabilité du nombre de copies de la cible ADN (forcément répétée) utilisée pour la PCR.

La cible ADN rep529 est de plus en plus utilisée pour le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose par PCR en temps réel et est recommandée par le LA. Il s'agit d'une séquence non-codante répétée en tandem, dont le nombre de répétitions n'est connu qu'approximativement (autour de 300) et pour une souche de référence.

Une étude ponctuelle a été réalisée par le LS de Toulouse, avec la participation du LS de Grenoble, avec pour objectif de valider l'utilisation de la cible rep529 pour la quantification absolue. A partir d'une gamme définie de parasites, le nombre de copies de cette cible a été évalué et comparé avec celui du gène unique SAG1. Ce dosage a été réalisé pour quatre souches du principal type taxonomique de *T. gondii* impliqué dans la toxoplasmose congénitale en France (type II) ainsi que pour 10 souches isolées en France de patients immunodéprimés. Elle montre un nombre de copies de rep529 relativement stable entre souches isolées de patients en France. Cependant, en raison du coefficient d'erreur inhérent à la technique, ce travail doit toutefois être poursuivi et affiné sur un plus grand nombre de souches.

7. Etat des lieux sur les pratiques en PCR-Toxoplasmose

Une étude rétrospective concernant les pratiques et les méthodes du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose entre 2002 et 2005 a été publiée (Sterkers et al., *Clin Microbiol Infect.* 2009). Cette enquête se poursuit de façon annuelle et a été menée au cours des éditions 2009 et 2010 du Contrôle de Qualité national. Elle montre une évolution lente vers une relative homogénéisation des méthodes, même si celle-ci est contrée par les choix pratiques et financiers dictés par les administrations de CHU. En particulier, la diversité des amorces utilisées s'est restreinte. En 2005, 25 laboratoires utilisaient 15 amorces sur 3 cibles ADN. En 2009, le nombre total d'amorces reste sensiblement identique pour 28 laboratoires: heureusement, 12 des 23 méthodes ciblant l'élément rep529 utilise les mêmes amorces (Reischl et al., *BMC Infect Dis.* 2003). La PCR-ELISA a disparu et un seul centre se repose désormais uniquement sur de la PCR conventionnelle. Seule une évaluation exigeante et multicentrique pourra avoir raison de cette diversité (voir projet).

Par ailleurs, une enquête extrêmement détaillée a été réalisée en 2007 en deux fois, abordant tous les aspects du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en prénatal et néonatal (pratiques pré-analytiques et analytiques, méthodes d'extraction, nombre de réactions nécessaires pour le DPN, utilisation des témoins négatifs et positifs, mesures de prévention des contaminations etc.). Les données de cette enquête n'ont pas été diffusées au réseau en raison de l'extrême diversité observée entre les méthodes et de la complexité de l'analyse qui devait en être faite, et de la difficulté de pouvoir tirer des conclusions à partir de ces données. Cette enquête sert toutefois de référence en ce qui concerne l'évolution et la diversité de ces méthodes pour la définition d'axes de travail concernant la standardisation.

D-2- Contribution à la surveillance épidémiologique et à l'alerte.

D-2.1 Contribution à la surveillance épidémiologique

2-1.1 Mise en place d'un système de surveillance des toxoplasmoses congénitales en France.

En 2006, lors de la création de ce CNR, un des objectifs majeurs était de contribuer à l'évaluation de la pertinence du programme national de prévention de la toxoplasmosse congénitale, instauré depuis 1978 en France et sans évaluation jusque là. Pour cela, l'InVS en partenariat avec le Pôle Epidémiologie du CNR a proposé d'établir un système de surveillance nationale de la toxoplasmosse congénitale basé sur une notification des cas de toxoplasmoses congénitales diagnostiqués sur le territoire national. Ce système de surveillance a été initié en 2006 et recueille annuellement les données des cas de toxoplasmoses congénitales en France (métropole et DOM) depuis 2007.

Pour établir ce système, I. Villena (responsable du Pôle Epidémiologie) en collaboration avec V. Goulet (médecin épidémiologiste) et L. King (épidémiologiste) de l'InVS ont réfléchi sur les différents systèmes de déclaration des maladies infectieuses en France. Un groupe de travail spécifique a été constitué en 2006 par l'InVS regroupant des membres du Pôle Epidémiologie du CNR (I. Villena, T. Ancelle, P. Thulliez), des épidémiologistes de l'InVS (V. Goulet, L. King, V. Vaillant) des médecins biologistes représentant des laboratoires publics ou privés effectuant le diagnostic de la toxoplasmosse congénitale (M. Wallon, Lyon, un représentant du laboratoire Ruffié, Bordeaux remplacé en 2007 par un représentant du laboratoire CERBA), un gynécologue-obstétricien (A. Berrebi, Toulouse), un pédiatre (P. Garcia, Marseille), un ophtalmologue (A. Brézin, Paris) et un médecin épidémiologiste en Santé Publique (C. Binquet, Dijon). Ce groupe a défini les objectifs du système national de surveillance et confié le développement d'un logiciel de déclaration annuel des cas au Laboratoire Coordonnateur du CNR (CHU Reims) en partenariat avec la Société Epiconcept reconnue pour sa compétence en matière d'analyses informatiques notamment dans le domaine de l'épidémiologie.

Les objectifs de ce système de surveillance sont les suivants :

- Constituer une base nationale des cas de toxoplasmosse congénitale afin d'estimer la prévalence de la toxoplasmosse congénitale en France.
- Recenser au moins 80 % des cas diagnostiqués en France
- Estimer le nombre de toxoplasmoses cliniques sévères à la naissance ou au moment du diagnostic (lésions neurologiques et oculaires)
- Produire des tableaux de synthèse, accessibles à tous les acteurs impliqués dans la toxoplasmosse en France et régulièrement actualisés.
- Suivre les tendances de cette prévalence en pérennisant la notification des cas au cours du temps (analyse des cas tous les ans, réalisée l'année N+ 6 mois afin d'inclure tous les enfants atteints notifiés l'année N -1, compris les cas notifiés en période anténatale).

En 2006, il a été décidé que cette surveillance n'avait pas d'objectif de suivi des toxoplasmoses congénitales et ne pourrait donc pas produire de données sur le nombre de séquelles à long terme dues à la maladie. Cet objectif pourra être mené secondairement avec la participation de quelques laboratoires du réseau ToxoSurv qui suivraient une cohorte d'enfants sur plusieurs années.

Le logiciel spécifique de notification (Toxosurv, Voozadoo , Epiconcept TM) a été élaboré par la Société Epiconcept (S. Becqerel, G. Desve) en collaboration avec le CNR (C. Pennaforte, I. Villena, C. Delmas, CHU Reims et T. Ancelle, CHU Cochin) et l'InVS (V. Goulet et L. King du DMI). La notification des cas se fait par une application de saisie sécurisée du logiciel Voozadoo, à partir de l'anonymisation du cas grâce. Les données individuelles (informations épidémiologiques, cliniques et biologiques) sur les cas de toxoplasmosse congénitale diagnostiqués en période anténatale et néo- ou postnatale ont été définies et ont permis l'établissement d'une fiche de collecte correspondant aux masques de saisie du logiciel ToxoSurv. Un contrôle des doublons est effectué automatiquement en cas de déclaration d'un même cas par deux laboratoires sur la base du code d'anonymisation.

Les droits d'accès au logiciel de notification sont définis par le Laboratoire Coordonnateur qui enregistre les laboratoires participants au réseau ToxoSurv dans la base. Le recueil des informations saisies dans la base est réalisé par I. Villena, C. Delmas (ARC) et T. Ancelle (Pôle Epidémiologie) qui ont élaboré dès 2006 un programme statistique produit spécifiquement pour l'analyse des résultats (développé sous STATA, Ritme Informatique TM).

Une adresse mail (toxosurv@chu-reims.fr) a été mise à disposition des laboratoires déclarants pour contacter (en cas de difficulté ou pour obtenir des informations) les responsables de ce système de notification (T. Ancelle, I. Villena et C. Delmas, ARC du CNR). Tous les trois visualisent ainsi les messages (qui sont archivés par l'ARC) et répondent aux questions relatives au fonctionnement du système.

Le logiciel de notification est hébergé par le CHU de Reims et la notification des cas est faite via le site Web ([https://www.chu-reims.fr/notification de cas](https://www.chu-reims.fr/notification%20de%20cas)).

Un dispositif de déclaration à deux niveaux a ainsi été retenu.

- Le premier niveau concerne les 35 laboratoires spécialisés susceptibles de diagnostiquer la majorité des cas. Ils déclarent leurs cas via Internet en utilisant l'application de saisie sécurisée du logiciel appelé « Voozано Toxosurv » (EpiConcept™). Chaque laboratoire participant possède un accès protégé. Les cas sont saisis dans une base nationale gérée par le CNR de la Toxoplasmose.

Deux modes de notification ont été élaborés, l'un pour la déclaration de cas diagnostiqués en période anténatale, et l'autre pour la déclaration de cas diagnostiqués en période néonatale ou postnatale (Annexe 5). Sont ainsi recueillies des données biologiques et cliniques sur la mère et l'enfant notamment la date de prélèvement avec un résultat positif, le mode de diagnostic, l'évolution de la grossesse et les détails des examens cliniques et paracliniques effectués chez l'enfant. Une fiche d'information à distribuer aux patientes a été élaborée pour permettre à chaque femme sollicitée d'exercer son droit de refus (Annexe 5). La mise en œuvre de ce traitement de données a reçu un avis favorable de la CNIL le 03 mai 2007.

Chaque cas est saisi par le biologiste sous forme d'un couple mère-enfant identifié par un code d'anonymat irréversible de 16 caractères généré à partir de l'identité de la mère (Logiciel d'anonymisation MDO version 1_2_2 © InVS 2003). Les logiciels d'anonymisation ont été fournis par l'InVS au Laboratoire Coordonnateur qui les a adressés aux 35 laboratoires spécialisés en même temps que les login d'accès au système. L'application développée «Voozано ToxoSurv» a la capacité d'identifier les doublons et de créer un lien entre une mère et son enfant lorsque le diagnostic de toxoplasmose congénitale est réalisé dans deux laboratoires différents sur la mère et son enfant. Chaque laboratoire qui déclare par Internet a accès à ses propres données qu'il peut extraire dans un fichier Excel® pour analyse.

Un guide d'utilisation du logiciel ToxoSurv, réalisé par l'InVS (L. King) et le Laboratoire du Pôle Epidémiologie du CNR (I. Villena, assistée de T. Ancelle) a été adressé à tous les laboratoires participants à ce système de surveillance.

- Le second niveau du système comprend les LBM effectuant occasionnellement le diagnostic de confirmation de cette maladie en période néonatale ou post-natale. Ils notifient les cas via une fiche papier anonymisée (selon le même principe de la DO mis en place pour la déclaration par Internet). Ces fiches sont pré-remplies avec le login identifiant de façon unique le laboratoire déclarant (code fourni par la base d'identification des laboratoires d'analyses médicales de l'InVS). Les fiches papiers sont transmises au CNR de la Toxoplasmose (Laboratoire Coordonnateur) qui les vérifie et les saisit dans la base de surveillance. La même lettre d'information est remise aux patientes concernées.

Constitution du réseau de surveillance (réseau ToxoSurv :Annexe 2) : ce réseau est basé sur les laboratoires membres du CNR (32 laboratoires jusqu'en 2009, 31 depuis la fermeture de IPP) élargis au CHU de Lyon (F. Peyron et M. Wallon, reconnus pour leur expertise en matière de toxoplasmose congénitale notamment par étude d'une cohorte de cas depuis de nombreuses années), aux laboratoires privés agréés en diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale (laboratoires CERBA et BIOMNIS). Ces partenaires déclarent directement les cas de toxoplasmose congénitale via le site Web.

En outre l'identification des laboratoires privés ou publics polyvalents pouvant diagnostiquer des cas de toxoplasmose congénitale a été réalisé en 2006 par voie de questionnaires en partenariat avec l'InVS (enquête juillet 2006) et ceci dans le but de leur proposer dès 2007 un système de notification des cas par fiche papier adressée au Laboratoire Coordonnateur.

La mise en place de ce système de surveillance a été publiée dans le BEH (8 avril 2008 / n° 14-15 ; p122-124) et a nécessité au cours de l'année 2009, une mise à jour des laboratoires participants suite aux notifications recensées en 2007 et 2008. Outre le nombre de laboratoires dits spécialisés dans ce diagnostic (n= 35) ; le nombre de laboratoires participants au réseau de surveillance est passé de 74 laboratoires (année 2007) à 13 (année 2008) et 16 (année 2009). Ce réajustement a été effectué par

appel de tous les laboratoires s'étant déclarés comme potentiellement participants (effectuant le diagnostic de toxoplasmose congénitale) et n'ayant notifié aucun cas depuis 2007. Une majorité de LBM hors laboratoires spécialisés ont précisé transmettre leurs examens biologiques vers un centre spécialisé (le plus souvent CHU) pour confirmation des cas. Ainsi, l'exhaustivité du recueil des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France paraît satisfaisante en reposant sur l'ensemble des laboratoires spécialisés (recueillant la majorité des diagnostics posés sur le territoire français) auxquels 16 laboratoires polyvalents (privés ou CH, dernière actualisation fin décembre 2009) s'ajoutent car posant le diagnostic de façon occasionnelle (1 à 3 cas par an). La représentativité nationale de la notification est assurée par l'ensemble des CHU, CHG et laboratoires privés déclarants, drainant l'ensemble du territoire (y compris DOM-TOM). Fin septembre 2009, l'IPP a fermé son laboratoire de biologie et les notifications de cas faites par P. Thulliez ont donc cessé. Cependant, les diagnostics de toxoplasmoses congénitales effectués à l'IPP se sont reportés sur les laboratoires spécialisés du réseau Toxosurv (enquête auprès des laboratoires du CNR en 2010 révélant une augmentation des demandes de diagnostic par chacun des laboratoires membres du réseau). Ainsi, nous estimons qu'il n'y a pas de perte d'information consécutive à cette fermeture.

Afin de sensibiliser les différents acteurs de la surveillance, une relance par mail est réalisée par le Laboratoire Coordonnateur, trimestriellement pour les 35 laboratoires spécialisés (notifiant via le Web) et semestriellement pour les autres (1-2 cas par an). De plus, une newsletter est rédigée par le Laboratoire Coordonnateur et adressée par mail à tous les correspondants du réseau « Toxosurv », elle présente les informations recueillies dans l'année écoulée (et notamment le logigramme sur la sévérité de la toxoplasmose congénitale) et rappelle les impératifs du système de surveillance.

King L., Villena I., Ancelle T., Wallon M., Garcia P., Thulliez P., Goulet V. La toxoplasmose congénitale : mise en place d'un dispositif de surveillance en France. BEH, numéro thématique 8 avril 2008, 122-24.

Résultat du système de surveillance : Le Laboratoire Coordonnateur fournit tous les ans à l'InVS un rapport synthétique sur les cas notifiés au cours de l'année N-1 (Annexe 3), ce rapport est présenté et diffusé (de manière détaillée) à l'ensemble des membres du réseau du CNR au cours de la réunion annuelle du réseau. Une extraction du rapport (avec données minimales choisies avec l'InVS) est mise sur le site Internet du CNR. (Annexe 4).

Ces activités de surveillance ont permis de présenter trois rapports en 2007, 2008 et 2009 publiés dans les rapports annuels d'activités. En outre, une réunion du comité de pilotage « Toxosurv » est organisée annuellement par l'InVS permettant une présentation des données du système de surveillance de l'année écoulée avec discussion entre les membres sur les objectifs de surveillance pour l'année à venir. Ces activités de surveillance ont conduit à la rédaction d'un article dans Eurosurveillance décrivant l'analyse des cas de toxoplasmoses congénitales diagnostiqués en France en 2007.

Villena I., Ancelle T., Delmas C., Garcia P., Brézin A.P., Thulliez P., Wallon M., King L., Goulet V. Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis. Congenital Toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. EuroSurveillance, 2010, 15, 14-19.

Au cours de l'année 2009, le programme statistique développé spécifiquement pour l'analyse des résultats a été revu par le Pôle Epidémiologie et avec les membres du comité de pilotage Toxosurv défini par l'InVS. Ce programme permet une meilleure lisibilité des résultats en les exprimant sous différents chapitres décrivant le réseau Toxosurv de recueil des cas (analyses par centres), l'épidémiologie de l'affection (caractéristiques des infections), les performances de diagnostic et l'évaluation du poids de la maladie par recueil des informations cliniques sur les cas diagnostiqués. L'ensemble de ces données permet de recueillir des indicateurs remarquables qui seront suivis au cours du temps pour connaître l'évolution de la maladie. Par ailleurs, un contrôle qualité de la base de notification des cas hébergée dans le logiciel Voozanoo a été mis en place par le CNR Coordonnateur par création d'un programme de contrôle automatique des cohérences afin de permettre une meilleure analyse de la base de données (recueillies grâce au logiciel spécifique « Toxosurv », Voozanoo) et un gain de temps pour la relance des informations à recueillir auprès des centres notifiant les cas. C'est l'ARC du CNR qui est en charge de la demande d'informations auprès des laboratoires déclarant en cas d'incohérence constatée lors de l'analyse (erreurs d'identification, de saisie des datations d'infection ou des items biologiques ou cliniques).

Pour l'année 2010, nous avons appliqué ce programme d'analyse et les résultats de la surveillance de l'année 2009 sont présentés en Annexe 3.

En 2010, 266 cas de toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiqués en France conduisant à une interruption de grossesse dans 23 cas (18 Interruptions de grossesse pour raison médicale et 5 Morts fœtales *in utero*) ; 228 enfants sont nés dont 8 présentent une atteinte sévère de la maladie et 17 une atteinte modérée, 203 enfants sont asymptomatiques à la naissance. Un logigramme représente le récapitulatif de ces cas en Annexe 3.

Ainsi, la **prévalence globale** de la toxoplasmose congénitale observée en France est de **3.2 pour 10 000 naissances** et la prévalence des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués à la naissance est de 1.9 pour 10 000 naissances. La létalité liée à la toxoplasmose congénitale est de 9.4% (en hausse par rapport aux deux années précédentes) et la morbidité globale représente 11% (voir tableau des indicateurs remarquables, Annexe 3).

L'ensemble de ces résultats ont été discuté avec l'InVS lors de la dernière réunion du Comité de pilotage « Toxosurv » le 19/11/2010.

Nous avons procédé à un récapitulatif des cas notifiés depuis 2007 et comparé les trois années de surveillance. Nous observons que depuis 3 ans, 36 laboratoires (sur les 51 potentiellement déclarants) ont déclaré au moins un cas au système de surveillance avec **un total de cas notifiés de 272 en 2007, 268 en 2008 et 266 en 2009**. Le devenir de 745 de ces 806 cas a été renseigné avec 50 interruptions de grossesse et 695 enfants nés vivants dont 617 asymptomatiques et 78 présentant des signes cliniques. La prévalence globale annuelle de la toxoplasmose congénitale est d'environ 3,1 pour 10000 naissances avec un taux de toxoplasmose symptomatique estimé à 0,3 cas pour 10000 naissances pour ces 3 années. Le système de surveillance des toxoplasmoses congénitales ToxoSurv est efficace fournissant pour la première fois des données nationales fiables actualisées. **Ainsi, la toxoplasmose congénitale paraît stable en France avec un nombre moyen annuel de 26 cas de toxoplasmose congénitale symptomatique et de 17 interruptions de grossesse.** La prévalence globale de la toxoplasmose congénitale est inférieure à celle estimée à partir d'enquêtes anciennes datant de plus d'une dizaine d'années. Ce système de surveillance est unique en Europe et témoigne de l'importance de la France dans le domaine d'étude de cette affection. Ces données seront transmises en 2011 à l'ECDC via l'InVS.

2-1.2 Participation à des études épidémiologiques pour actualiser les données épidémiologiques de la toxoplasmose en France.

Les objectifs du Pôle Epidémiologie du CNR de la Toxoplasmose doivent permettre une évaluation de l'incidence et de la prévalence de la toxoplasmose d'une façon générale (circulation du parasite) et en particulier des toxoplasmoses congénitales. Le CNR doit contribuer à la mesure de l'efficacité des mesures de prévention ou de dépistage mises en place depuis de nombreuses années en collaboration avec l'InVS. L'ensemble des études épidémiologiques doivent intéresser les différentes communautés de France métropolitaine mais aussi des DOM-TOM qui vivent dans des contextes environnementaux différents avec des particularités socioculturelles souvent marquées.

Une enquête sérologique ponctuelle a été réalisée sur des sérums collectés par l'InVS (échantillon de 2060 sérums de différentes classes d'âge appartenant à une sérothèque nationale constituée en 1997), en vue d'obtenir la prévalence de la toxoplasmose par sexe et par tranche d'âge (de 1 à 64 ans). Cette enquête a été confiée par le CNR Coordonnateur à un des laboratoires experts du Pôle Sérologie au CHU de Grenoble où avait également lieu une étude sérologique sur la sérologie herpétique. Les sérums ont été testés en 2008-2009, à la recherche d'anticorps anti-Toxoplasma par ELISA (AxSYM Abbott, Vidas BioMérieux). Les résultats ont été interprétés et transmis à l'InVS qui a réalisé l'analyse statistique grâce au logiciel Stata 9.2 par une stagiaire (H. Bellali épidémiologiste Profet, DMI InVS). Les résultats ont été discutés avec le laboratoire ayant exécuté les analyses (CHU Grenoble), le Laboratoire Coordonnateur et l'InVS : la prévalence globale en France en 1997 est de 54% (52-56%) avec une prévalence dans la tranche d'âge 18-45 ans de 55,7%, comparable à celle observée chez les femmes de l'ENP de 1995 ; en outre d'importantes variations selon les zones d'habitation, ces variations étant superposables à celles observées dans l'ENP de 1995. Enfin, il est observé que la prévalence augmente considérablement entre 10 et 20 ans, et qu'il n'existe pas de différence de séroprévalence entre les hommes et les femmes dans la tranche d'âge 18-45 ans. Cette étude a permis de conclure que les résultats obtenus dans les ENP sont extrapolables à la population générale. Une publication est en cours associant les laboratoires de Grenoble et de Reims.

Le CNR a répondu à l'Appel d'offre initié par l'INED en collaboration avec l'InVS visant à la constitution d'une cohorte nationale (cohorte ELFE) d'enfants qui naîtront en 2011 et qui seront suivis longitudinalement sur une durée de 20 ans. Le CNR a participé à l'élaboration du questionnaire qui sera relevé en maternité pour la question relative à la toxoplasmose et a analysé courant 2009 les échantillons (201 sangs du cordon) collectés lors de l'enquête pilote conduite en 2007 dans un échantillon de maternités. Les résultats sérologiques ont permis de vérifier la concordance des données issues du recueil d'informations dans le carnet de maternité (statut sérologique des mères) et de les comparer aux résultats des enquêtes périnatales. La bonne concordance avec les données de l'enquête périnatale a incité le CNR en accord avec l'InVS à ne pas étudier de façon systématique les sangs du cordon des enfants de la cohorte à venir mais de pouvoir contrôler si nécessaire, les résultats issus du recueil d'informations relevées dans le carnet de maternité (notamment si une prise de médicaments anti-toxoplasmiques en cours de grossesse est indiquée). Les toxoplasmoses congénitales pourront ainsi être repérées et confirmées par le CNR (vérification de leur notification) avec le cas échéant recueil des données du suivi des enfants atteints sur une durée de 20 ans.

2-1.3 Un rapport visant à une évaluation du programme national de dépistage de la toxoplasmose congénitale a été mené par l'HAS à la demande de la DGS, avec notamment la participation de membres du CNR (H. Pelloux, P. Thulliez, I. Villena) et l'InVS (V. Goulet) ainsi que d'autres professionnels de santé impliqués dans cette affection. Les recommandations de l'HAS ont été publiées en octobre 2009 avec comme conclusion la décision de ne pas modifier la surveillance sérologique telle que pratiquée à l'heure actuelle et en précisant que « *Les recommandations concernant la surveillance sérologique de la toxoplasmose devront faire l'objet d'un réexamen en fonction des données d'efficacité obtenues par l'essai contrôlé randomisé et des résultats consolidés du système de surveillance de la toxoplasmose qui vient d'être mis en place sous l'égide du CNR de la Toxoplasmose et de l'Institut de veille sanitaire. Cette réévaluation, dont l'opportunité devra être appréciée de façon régulière en fonction de l'évolution des connaissances, devra être engagée au plus tard 5 ans après la publication des présentes recommandations* ».

Ce rapport a permis d'appuyer la demande de deux PHRC nationaux visant à évaluer les traitements proposés dans la prévention de la toxoplasmose congénitale ou dans les schémas thérapeutiques proposés aux enfants atteints :

PHRC TOXOGEST : Essai clinique, randomisé, multicentrique comparant l'efficacité et la tolérance d'un traitement prénatal par l'association pyriméthamine et sulfadiazine *versus* spiramycine pour réduire la transmission verticale de *Toxoplasma gondii* après primo-infection pendant la grossesse.

Promoteur de l'essai : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (PHRC 2009)

Investigateur Coordonnateur : Pr Laurent Mandelbrot

APHP Hôpital Louis Mourier, Service de Gynécologie-Obstétrique – Université Paris 7 Diderot -

Objectif principal :

Comparer l'efficacité du traitement prénatal, débuté dès le diagnostic de séroconversion toxoplasmique, par l'association pyriméthamine-sulfadiazine, *versus* la spiramycine, sur la réduction de transmission materno-fœtale de l'infection par *Toxoplasma gondii*.

Objectifs secondaires :

- Décrire les effets indésirables et comparer leur fréquence dans les deux groupes de traitement
- Etudier l'effet du délai de mise en place du traitement anténatal sur le risque de transmission

Méthode :

Essai clinique, randomisé, selon deux groupes parallèles, sans insu, multicentrique, national.

PHRC TOSCANE : Etude multicentrique, randomisée de non infériorité de deux stratégies thérapeutiques chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale.

Promoteur de l'essai : Centre Hospitalier Universitaire de Dijon (PHRC 2009)

Investigateur Coordonnateur : Pr JB Gouyon, Service Néonatalogie, CHU Dijon

Centre d'Investigation Clinique : CHU Lyon

Objectif principal :

Évaluer l'intérêt préventif sur les rétinoblastomes d'un traitement de 12 mois (au lieu de 3 mois comme dans d'autres pays Européens) chez les enfants atteints de toxoplasmose congénitale non sévère.

Méthode :

Essai clinique, randomisé, selon deux groupes, sans insu, multicentrique, national.

Pour ces deux PHRC, I. Villena s'est impliquée en tant que co-investigateur faisant partie du comité de pilotage de chacun de ces PHRC, prenant en charge la coordination des laboratoires de parasitologie impliqués dans ces programmes. Il est important de **noter que la majorité des laboratoires membres du CNR** de la Toxoplasmose participent à ce PHRC en association avec les services médicaux (Gynécologie-Obstétrique et Pédiatrie) de leur CHU directement impliqués. **Ces deux PHRC ont démarré en 2010.**

2-1.4 Collaboration avec les laboratoires en santé animale

En Epidémiologie animale, face à la méconnaissance des données sur la circulation du parasite en faune animale (domestique et sauvage), il a été décidé de mettre en place des études de séroprévalence (avec le Pôle Epidémiologie) et un recueil des souches animales afin d'établir une comparaison entre souches humaines et animales (avec le Pôle Souches).

Un réseau de correspondants en santé animale a été établi (Laboratoires Vétérinaires Départementaux, réseau SAGIR avec l'ANSES Nancy, ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage) pour les études sur la faune sauvage et sur les élevages. Dans le cadre d'activités de recherche menés par les "Pôles Epidémiologie et Souches, la collection du CRB *Toxoplasma* s'est également enrichie de souches d'origine animale, de diverses provenance (France et autres pays dont l'Afrique) afin de comparer d'une part les souches d'origine humaine et celles d'origine animale et d'autre part de mieux appréhender la circulation du parasite par comparaison entre les divers pays d'où sont isolées des souches (principalement animales).

Par ailleurs, le CNR collabore avec le Laboratoire National de Référence (LNR) des parasites transmis par les aliments de l'AFSSA-LERPAZ (responsable P. Boireau) pour des études visant à une meilleure connaissance de l'impact de l'alimentation sur la contamination humaine. Cet objectif s'inscrivait comme prioritaire dans les recommandations émises dans le rapport «Toxoplasmose » publié par l'AFSSA en 2005 rappelant l'absence de surveillance du cheptel en matière d'infection par *Toxoplasma* et les risques croissants de contamination humaine. Des programmes de surveillance, établis et financés par la DGAL, portant sur l'évaluation de la présence de toxoplasmes dans la viande de boucherie destinée à la consommation humaine ont ainsi été menés dans ce cadre (programme sur la viande ovine en 2007 et sur la viande bovine en 2009), ils ont été conduits par le Laboratoire Coordonnateur et le Laboratoire du LNR des parasites transmis par les aliments. Le Laboratoire Associé Souches a collaboré à ces programmes en génotypant les souches isolées des carcasses fraîches. Les analyses statistiques ainsi que le plan d'échantillonnage ont été réalisés par la DERNIS (Direction d'évaluation des risques en nutrition et santé, Maisons-Alfort) de l'ANSES (A. Thébault).

Ces plans ont conduit à estimer le portage de ce parasite en France dans les élevages. Pour les ovins en 2007, la séroprévalence globale estimée était de 17,7% (11,6–31,5%) pour les agneaux et 89% (73,5–100%) pour les adultes. Des parasites vivants étaient présents dans 11,9% [9-15,5%] (48/402) des carcasses d'origine française (principalement chez des agneaux). Pour les bovins en 2009, le pourcentage de séropositivité globale chez les bovins est de 13% [11à 14%], ce qui signifie que les animaux concernés ont été en contact avec le parasite au cours de leur vie. Ce résultat est valable pour l'ensemble des bovins, qu'ils soient originaires de France, de l'Union européenne ou de pays tiers. Pour les bovins d'origine française en 2009, la séroprévalence globale estimée était de 11% (9-12%) et de 2,5% pour la viande de veau (moyenne à 3% si l'on considère tous les veaux étudiés quelle que soit leur provenance). La présence de parasites vivants a été retrouvée sur deux carcasses d'origine française (0,03-0,3%). Cet isolement de souches de bovins est rare (une seule publiée dans la littérature) et souligne bien la possibilité de contamination humaine par consommation de cette viande.

Les Rapports de ces plans ont été rédigés par le CNR et le LNR et transmis à la DGAL et validés respectivement en mai 2008 et février 2011.

*Halos L., Thébault A., Aubert D., Thomas M., Perret C., Geers R., Alliot A., Escotte-Binet S., Aizenberg D., Dardé M.L., Durand B., Boireau P., Villena I. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J Parasitol*, 2010, 40, 193-200.
Publication en cours pour le plan bovins.*

D-2.2 Contribution à l'alerte et investigation des cas groupés

La toxoplasmose étant le plus souvent asymptomatique, il est difficile d'identifier des cas groupés et donc de déclencher une alerte. Cependant quelques épisodes ont marqué la période 2006-2010. La collaboration des différents laboratoires membres du CNR est capitale pour une circulation rapide de l'information et le recueil des cas.

En 2008, une alerte sur la présence de cas groupés de toxoplasmose a été donnée au Laboratoire Coordonnateur fin décembre par un des laboratoires membre du Pôle Epidémiologie (Laboratoire de Parasitologie du CHU de Montpellier) : 13 patients (immunocompétents) résidant dans la couronne de l'agglomération de Montpellier ont été recensés pendant une durée de 2 mois (novembre 2008 à décembre 2008), une toxoplasmose évolutive d'un point sérologique a été relevée avec pour certains cas une virulence clinique.

Le signalement initial provenait d'un laboratoire d'analyses de biologie médicale de l'agglomération. Un signalement a été fait par le CNR à l'InVS le 22 janvier 2009 et à la CIRE du Languedoc –Roussillon ; une investigation des cas a alors été menée par la CIRE en collaboration avec l'InVS, le CNR et le laboratoire du CHU de Montpellier dès le mois de janvier 2009 afin de caractériser cette « épidémie ». Une enquête descriptive a été réalisée avec recherche active de cas biologiquement confirmés auprès des laboratoires d'analyses de la zone d'étude et recueil d'informations sur l'exposition des cas à partir d'un questionnaire standardisé. Parallèlement à ces investigations, des enquêtes alimentaire et vétérinaire ont été menées afin d'identifier les aliments en cause. Au total, entre mi octobre et fin décembre 2008, sur 27 cas d'infection toxoplasmique relevés par les laboratoires, 21 étaient confirmés par l'expertise biologique et 15 étaient retenus [1 homme et 14 femmes dont 4 enceintes, âge : 13-57 ans] du fait des informations épidémiologiques collectées. Une grande majorité des cas (n=12) était symptomatique (forme aiguë symptomatique avec présence de fièvre, asthénie et adénopathies). L'allure de la courbe épidémique était en faveur d'une source possible de contamination à durée limitée, avec une période de contamination des cas s'étendant de fin septembre à mi-novembre 2008. Après investigation, l'absence de repas commun entre les cas a été vérifiée lors de l'enquête épidémiologique. L'analyse des expositions n'a pas conduit à identifier l'existence d'une source alimentaire commune à l'ensemble des cas, notamment du fait du délai entre la période d'exposition des cas et le moment où les cas groupés ont été identifiés par le laboratoire, puis confirmés par un laboratoire de référence. Seuls quatre cas (27 %) avaient consommé du cheval, dont trois cas dans la même famille (consommation saignante). L'hypothèse la plus probable est la survenue de plusieurs épisodes indépendants de cas groupés et de cas sporadiques dans la zone d'étude. Enfin, aucune souche n'a été isolée à partir des 15 cas identifiés. Les Drs Pratlong, Ancelle et Villena ont participé (au titre du CNR) à cette investigation et à la rédaction du rapport publié par l'InVS et la CIRE DU Languedoc-Roussillon. Cette investigation a permis de souligner différents points relatifs aux modalités d'investigations des cas groupés de toxoplasmose, notamment par l'élaboration d'un questionnaire précis relatif à la description de la toxoplasmose et aux sources possibles de contamination.

« Cas groupés de toxoplasmose, Montpellier et ses environs, octobre 2008-janvier 2009. » Rapport de l'InVS et l'ARS Languedoc Roussillon, mis en ligne le 31/12/2010.

En 2009, une alerte a été signalée à l'InVS par le Laboratoire Associé du Pôle Souches et un des laboratoires membre du Pôle Epidémiologie (Laboratoire de Parasitologie du CHU de Nice) concernant la possibilité d'une contamination par consommation de viande de cheval importée ayant entraîné une forme gravissime de toxoplasmose. Il s'agissait d'un sujet de 74 ans présentant un tableau de pneumopathie (mars 2009) résistante aux antibiotiques à large spectre et aux antifongiques. Une PCR à la recherche de toxoplasme a été réalisée le 16 avril révélant une parasitémie importante (20000 parasites/ml). Le patient est décédé le 19 avril. Le génotypage à partir de l'ADN isolé du patient a révélé l'implication d'une souche atypique. L'interrogatoire de la petite fille du patient a retrouvé la notion de consommation de viande de cheval consommée crue pendant les mois précédents l'hospitalisation. L'implication de viande cheval importée du Canada a été fortement suspectée en raison du caractère atypique de la souche et de l'enquête avec isolement d'autres souches atypiques à partir de viande de cheval importée du Canada.

L'implication de la viande de cheval dans la contamination a été également retrouvée dans un autre cas en 2010: chez un enfant atteint de toxoplasmose congénitale dont la mère avait consommé de

la viande de cheval crue en provenance du Brésil. La souche isolée du placenta a révélé la présence d'un génotype atypique brésilien.

La viande de cheval importée du continent américain a été confirmée comme une source potentielle de la circulation en France métropolitaine de génotypes atypiques, avec ce nouveau cas de toxoplasmose congénitale liée à la consommation de cette viande.

Ces dossiers sont à rapprocher des suspicions d'implication de la viande de cheval i) dans un cas de réinfection chez une femme enceinte avec toxoplasmose congénitale disséminée (décrite dans le rapport d'activités 2007) ii) dans trois des cas groupés observés à Montpellier.

Ces différents cas ont été publiés par des membres du CNR Pôle Souches (ML Dardé, D. Ajzenberg) et du CNR Pôle Epidémiologie (P. Marty, C Pomares)..

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review.

Pomares C, Ajzenberg D, Bornard E, Bernardin G, Hasseine L, Dardé ML, Marty P. Toxoplasmosis and horse meat, France. Emerg Infect Dis. En cours

Ainsi, les viandes importées (notamment du continent américain) pourraient représenter un risque de contamination plus sévère par la présence de génotypes atypiques plus virulents à l'origine de toxoplasmose sévère ou possiblement de recontamination par une souche virulente entraînant une pathologie chez un patient antérieurement immunisé .

Ces différents arguments ont conduit le Pôle Epidémiologie du CNR en collaboration avec le LNR « Parasites transmis par les aliments » (ANSES, Maisons-Alfort) à proposer à la DGAL un plan de contrôle de la viande de cheval importée pour 2010 ; celui ci n'a pas été validé par la DGAL pour cette année, bien que soutenu par l'InVS. Il sera représenté à cette tutelle courant 2011. Cette information a été relayée en 2010 via le LNR (ANSES) aux différents LNR communautaires. Une étude pilote est en cours au LA du Pôle Souches.

En 2010, une Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) a été signalée au CNR (Laboratoire Coordonnateur) par l'InVS en provenance de la Cellule régionale de Veille et de Gestion Sanitaire (CVGS) Midi-Pyrénées.

Un signalement avait été fait le 15 novembre 2010 par un médecin généraliste de l'Aveyron qui signalait 3 cas de toxoplasmose symptomatiques (fièvre, forte asthénie, adénopathies multiples) confirmés sérologiquement, les 3 cas étaient issus de la même famille (jeunes adultes frère et sœurs) et avaient pris un seul repas commun le 3/10/2010, faisant suspecter une TIAC. L'investigation et la recherche active de cas ont permis de retrouver d'autres cas. Les cas initiaux avaient partagé un seul repas commun le 3 octobre 2010, réunissant 7 personnes : 4 jeunes adultes frères et sœurs, leurs parents et un jeune ami. A la suite de ce repas, 5 personnes ont développé une toxoplasmose: les quatre enfants et l'ami, soit un taux d'attaque de 71,4%. Les cas initiaux avaient tous partagé le même repas. Le Laboratoire Coordonnateur a confirmé les sérologies faites initialement dans différents LBM et a ensuite étudié les sérologies effectuées fin décembre confirmant la toxoplasmose évolutive chez tous les cas retenus. L'enquête alimentaire a permis de suspecter l'aliment contaminant à l'origine des cas, il s'agissait d'un gigot d'agneau (consommé peu cuit) qui avait été acheté le 2 octobre et dont la moitié était conservée au congélateur. Ceci a permis à la Direction des Services Vétérinaires de réaliser un prélèvement pour analyse par PCR par le laboratoire du CNR, montrant la présence d'ADN toxoplasmique avec un nombre élevé de copies. Cet ADN a pu être génotypé par le Laboratoire Associé du Pôle Souches, il s'agissait d'un génotype II, habituel en France. Une alerte sur cet événement a été faite par le Laboratoire Coordonnateur à tous les laboratoires membres du réseau du CNR ainsi qu'aux laboratoires du réseau Toxosurv, de façon à identifier d'autres éventuels cas. La surveillance clinique a été faite selon les conseils du CNR avec examen ophtalmologique ne relevant aucune atteinte et prélèvement de sang circulant pour étude en PCR à la recherche d'une parasitémie encore présente, ce prélèvement effectué lors du contrôle sérologique à 1 mois s'est révélé négatif. Aucun autre cas n'a été retrouvé à la suite de l'investigation avec recherche dans un périmètre de 20 km aux alentours de la boucherie où avait été acheté le gigot. Un rapport est en cours de rédaction associant la Cire Midi-Pyrénées, l'InVS et le CNR (I. Villena et T. Ancelle ayant participé à l'investigation des cas).

Une des missions du CNR est de contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire tout événement inhabituel. En cas d'isolement de souches de toxoplasme de virulence anormale, le

CNR (Pôle Epidémiologie et Pôle Souches) informe l'InVS de l'existence de ces souches en les caractérisant d'un point de vue génétique.

La majorité des souches retrouvées en France est de génotype II sans virulence chez la souris, les manifestations cliniques qui s'y rattachent peuvent cependant être sévères en fonction notamment du statut immunitaire du patient. La présence de souches virulentes en Guyane Française a incité à une surveillance accrue dans cette région des cas de toxoplasmose, ceci est effectué en collaboration avec le laboratoire du CHU de Cayenne et le laboratoire de Saint Laurent du Maroni (membre du Pôle Epidémiologie et du Pôle Souches). La connaissance de ces cas graves commence à être répandue aussi bien dans le corps médical guyanais que dans la population informée de la nécessité de bien faire cuire la viande de brousse.

En 2004, une épidémie de toxoplasmose sévère est survenue dans un petit village de 35 habitants du Suriname, sur le Maroni, frontalier de la Guyane Française. La plupart des patients ont été pris en charge à Saint Laurent du Maroni. Une enquête sérologique et épidémiologique a été menée dans le village (M. Demar, Laboratoire Support du Pôle Souches). Onze cas ont été répertoriés : 8 cas avec atteinte multiviscérale (dont 1 mortel) chez des adultes, 2 cas de toxoplasmose congénitale létale et 1 cas de toxoplasmose pauci-symptomatique chez un enfant. L'enquête épidémiologique n'a pu formellement identifier la source de l'infection, même si l'ingestion d'eau contaminée semble l'hypothèse la plus probable.

Demar M, Aizenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. Clin Infect Dis. 2007 Oct 1;45(7):e88-95.

En 2010, un patient habitant en Guyane a été hospitalisé à Bichat le 26/07 pour une toxoplasmose sévère avec troubles neurologiques et pneumopathie évoluant depuis trois semaines. Le tableau clinique s'est aggravé avec atteinte multiviscérale (oculaire, cardiaque, hépatique et pancréatique). Le bilan biologique (fait par un laboratoire membre du réseau du CNR, CHU Bichat) a confirmé une toxoplasmose acquise (avec présence de marqueurs récents d'infection) et la PCR effectuée dans le sang circulant a confirmé la parasitémie encore persistante. L'inoculation à la souris par le laboratoire du Pôle Epidémiologie a permis l'isolement de la souche responsable de l'atteinte, celle-ci a été génotypée par le Laboratoire Associé du Pôle Souches, confirmant le génotype atypique circulant habituellement en Guyane et responsable de toxoplasmose grave souvent multiviscérale. L'enquête alimentaire a permis de retrouver la consommation de viande de Maipouri (tapir) rapporté de la chasse par un ami et cuisiné sous forme de steak. Lors du repas contaminant, l'épouse du patient et ses enfants ont consommé cette viande cuite alors que le patient l'a consommée saignante (expliquant la contamination) tout comme son père mais qui n'a pas présenté de symptomatologie. Sous traitement anti-toxoplasmique adapté (pyriméthamine-sulfadiazine pendant 6 semaines), le patient s'est amélioré sans séquelle ultérieure. De la viande congelée a pu être récupérée chez le père du patient. . De l'ADN parasitaire a été retrouvé par le laboratoire du CH de Cayenne, mais le génotypage a été infructueux en raison d'une trop faible quantité d'ADN (Laboratoire Associé du Pôle Souches). Ce cas est en cours d'édition (2012).

D-3- Conseil aux professionnels ou aux autorités de santé

D-3.1 Missions de formations aux professionnels de santé

Pour répondre à cette mission, le CNR met en place plusieurs niveaux d'information et de formation. Ainsi, le Laboratoire Coordonnateur, les Laboratoires Associés et les laboratoires constitutifs du réseau du CNR sont des lieux d'enseignement, de stage et de formation de par leur nature hospitalo-universitaire.

Les activités de formation pour la période 2006-2010 par les différents laboratoires constitutifs du CNR sont listées dans l'Annexe Enseignement-Formations.

Dès l'année 2006, des activités de communications ont eu lieu pour assurer la diffusion de la création de ce CNR auprès des différents professionnels de santé en particulier par les membres du réseau de laboratoires constitutifs du CNR lors de réunions professionnelles et/ou staffs de Service auxquels ils participent.

D-3.2 Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Pour le diagnostic sérologique, plusieurs enquêtes menées par le Laboratoire Associé Pôle Sérologie ont eu lieu avec les membres du CNR de la Toxoplasmose au cours du dernier mandat :

- Enquête sur l'évaluation des pratiques de diagnostic sérologique auprès des laboratoires du réseau (2006)
- Rédaction d'un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques par le groupe de travail. (2007)
- Mise au point de questionnaires, sur les modalités de prise en charge d'un sérum « problématique » et en fonction des situations cliniques rencontrées. (2007)
- Validation d'un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques par le groupe de travail et mise en forme de logigrammes. (2008)
- Rédaction et validation par le groupe de travail de questionnaires, sur les modalités de prise en charge d'un sérum « problématique » et en fonction des situations cliniques rencontrées. (2008)
- Création d'une liste des laboratoires experts pour le diagnostic de la toxoplasmose mentionnant les correspondants médicaux et les spécificités techniques proposées par ces laboratoires et mise à disposition des professionnels sur le site du CNR. (2009)
- Publication du guide d'interprétation et des logigrammes dans la revue « les feuillets de biologie » et mise en ligne sur le site du CNR (2010).

Villard O., Jung-Etienne J., Cimon B., Franck., Fricker-Hidalgo H., Godineau N., Houze S., Paris L., Pelloux H., Villena I., Candolfi E. et le réseau du Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. Feuillets de Biologie, 2011, 298, 43-49.

- Enquête sur les séroconversions toxoplasmiques sans IgM ou avec des IgM fugaces au sein du réseau du CNR afin d'évaluer la fréquence de ces dossiers. (2010)
- Enquête auprès des laboratoires du réseau pour analyser de manière globale les résultats des techniques d'avidité des IgG réalisées afin d'avoir une idée de l'apport de cette technique dans la datation des infections toxoplasmiques. (2010)

Le résultat de ces enquêtes est diffusé aux membres du réseau du CNR et discuté lors des réunions annuelles, permettant un échange sur les pratiques et la validation des propositions du Laboratoire Associé Pôle Sérologie.

Pour le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire :

En 2010 : Un premier volet de recommandations, adressé aux professionnels de santé, a été rédigé par le GdT. Il attire l'attention sur les difficultés et l'interprétation de ce diagnostic et fait le point sur la conduite à tenir recommandée en cas de diagnostic positif ou négatif. Ces recommandations concernent le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, mais il peut être envisagé dans les années suivantes de

les élargir à la toxoplasmose de l'immunodéprimé. Ce document doit aujourd'hui être travaillé par l'ensemble du CNR avant sa mise en ligne.

Un deuxième volet de recommandations est abordé en 2011; il s'adressera aux biologistes amenés à réaliser ce diagnostic moléculaire, et portera sur les bonnes pratiques de ce diagnostic.

D-3.3 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

3-3.1 Rétro-information aux partenaires membres du CNR

- **Une réunion annuelle** a lieu depuis la création du CNR de la Toxoplasmose (22/03/2006, 17/10/2007, 16/10/2008, 25-26/09/ 2009, 24-25 /09/2010). Cette réunion est organisée à l'initiative du Laboratoire Coordonnateur et des 3 Laboratoires Associés, réunissant l'ensemble des Laboratoires faisant partie du réseau national. Une très bonne participation est observée (entre 22 et 29 centres sur 32 ont ainsi participé chaque fois).

Ces réunions sont l'occasion de présenter les travaux réalisés au cours de l'année et fixant les objectifs de l'année suivante, cette réunion permet un échange direct et la validation des décisions proposées par les Pôles d'activités. L'ensemble des communications présentées est adressé aux membres du CNR de la Toxoplasmose (présents et absents) dans le mois suivant cette réunion.

- **Envoi des Rapports d'activités** adressés à tous les membres du CNR. Cet envoi est effectué dès la transmission du rapport à l'InVS (mois d'Avril). Un envoi par mail de la réponse de l'évaluation du CNR par le Comité des CNR (InVS) est fait dès réception de celle-ci (lettre scannée à tous les membres du CNR). Pour l'année 2010, le rapport annuel d'activités est inclus dans le dossier de demande de renouvellement du CNR qui sera adressé après envoi à l'InVS.

- **Les résultats du Contrôle de Qualité Externe National** de biologie moléculaire sont rendus par courrier de façon personnalisée. Les données des enquêtes réalisées par le Pôle Biologie Moléculaire ont fait l'objet d'une information par courriel à chacun des centres.

- **Information individuelle des résultats des génotypages** des souches envoyées au CNR : depuis 2009, un envoi individuel des résultats des génotypages selon les modalités de l'informatique du laboratoire du CHU de Limoges a été systématisé pour tous les membres adressant des souches ou ADN au Pôle Souches.

- envoi de compte-rendu individuel pour chaque prélèvement adressé au CNR
- envoi de bilan par listing Excel au minimum une fois par an
- bilan présenté lors de la réunion CNR annuelle

- **L'envoi des résultats du Plan d'Analyse Toxosurv** est réalisé pour tous les membres constitutifs du réseau de surveillance Toxosurv dépendant du CNR de la Toxoplasmose (51 laboratoires jusqu'en 2009, 50 en 2010). Le plan définitif d'analyse des cas toxoplasmoses congénitales diagnostiqués dans l'année N-1 et notifiés au CNR est adressé à chaque membre après sa validation par le Comité de Pilotage Toxosurv (lors d'une réunion à l'InVS). Pour les membres du réseau Toxosurv, c'est un plan très détaillé qui est fourni incluant les données relatives à l'épidémiologie et au diagnostic biologique détaillé.

Le système de surveillance pour la toxoplasmose congénitale mis en place par le Laboratoire Coordonnateur prévoit dans sa structuration des relances périodiques par voie de mail ou courriers (y compris appels téléphoniques pour répondre à certaines demandes spécifiques). Ces envois ainsi que leurs réponses sont tracées.

En outre, le Laboratoire Coordonnateur envoie à tous les membres du réseau une « newsletter » annuellement rappelant les principaux résultats de la surveillance de l'année écoulée et les modalités de notification avec indication des nouveautés adoptées en réunion de CNR si nécessaire.

De plus, un mail est adressé à tous les centres du réseau Toxosurv au mois de janvier (année N) faisant un rappel de clôture de la notification de l'année écoulée (N-1) et un mail est adressé au mois de mai, mail personnalisé à chacun des centres pour confirmer le nombre de cas déclaré dans la base par le centre ainsi que demander les corrections ou le remplissage des données manquantes (à partir de l'extraction des données de la base effectuée au mois d'avril de l'année N).

En 2010, l'envoi du plan de surveillance validé a été fait le 18/01/2011 avec rappel pour notification des cas diagnostiqués en 2010.

- Une adresse mail ***toxosurv@chu-reims.fr*** est à la disposition de tous les membres du réseau Toxosurv pour toutes questions relatives à la notification des cas de toxoplasmose congénitales, elle est consultable simultanément au CHU de Reims par le Coordonnateur du CNR (I.Villena), l'ARC (C. Delmas) et T. Ancelle du Pôle Epidémiologie (CHU Cochin) permettant ainsi une réponse rapide, l'ensemble des mails est tracé et conservé par l'ARC du Laboratoire Coordonnateur.

3-3.2 Diffusion aux professionnels : conférences, Site web

Un site Internet a été créé dès 2007 par le Pôle Epidémiologie (http://www.chu-reims.fr/CNR_toxoplasmose), il est commun à l'ensemble des Laboratoires Associés du CNR Toxoplasmose. Ce site assure la présentation du CNR (organigramme, missions) et permet la notification directe des cas de toxoplasmose congénitale. Les Rapports annuels d'activités sont mis en ligne sur le site Internet une fois validé par l'InVS. Les documents (guides ou publications) rédigés par les Pôles d'activités du CNR sont aussi mis en ligne. D'autres documents ou rapports utiles pour l'information aux professionnels pourront aussi être mis en ligne dans le prochain mandat ; de même une actualisation des congrès relatifs à la toxoplasmose sera faite.

Des résultats partiels du Plan d'Analyse Toxosurv sont diffusés via le site Internet, les données mises en ligne ont été discutées au sein du Comité de Pilotage: ces données visent à présenter le réseau et les principaux résultats de cette surveillance avec le logigramme récapitulatif des cas (Annexe 4).

Ce site offre un lien avec le site de l'InVS ainsi qu'avec le Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma* (<http://www.crb.toxo.com>) créé en 2008 et en lien avec le Pôle Souches.

Pour répondre à une demande de nombreux laboratoires d'analyses français ou de professionnels de santé (gynécologues obstétriciens en particulier), **une liste des laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose a été mise sur le site internet**. Cette liste présente les laboratoires experts pour le diagnostic de la toxoplasmose mentionnant les correspondants médicaux, les diagnostics pratiqués avec les spécificités techniques pour les méthodes immunologiques pratiquées au sein de chacun des laboratoires. Cette liste sera diffusée aux LBM français pratiquant la sérologie toxoplasmique.

F – DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU CNR

Tous les laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose sont en démarche qualité et tous ont rédigé leurs procédures selon le GBEA. Ils sont engagés dans le processus d'accréditation selon la norme ISO 1589 pour la biologie médicale.

Le Laboratoire Coordonnateur et les trois Laboratoires Associés sont en phase active d'accréditation et disposent d'un référentiel qualité sous la responsabilité du chef de service et d'un responsable qualité.

F-1 Laboratoire Coordonnateur

Le Laboratoire Coordonnateur est engagé dans une démarche d'accréditation (norme ISO 15189) pour le diagnostic de la toxoplasmose. Un PH (Dr Foudrinier) est Responsable Qualité, elle est titulaire d'un DU de Qualité (Marseille, diplôme 2007). Ce PH assure la qualité des procédures instaurées dans le laboratoire qui a déjà bénéficié de 5 audits internes qualité (dont certains réalisés par des auditeurs externes à la structure du CHU). Deux techniciennes ont suivi une formation à l'audit et procèdent à des audits internes des différents secteurs diagnostic. Le calendrier proposé pour l'accréditation du laboratoire est intégré au calendrier plus général du Pôle de Biologie du CHU de Reims. Il est acté avec la direction du Pôle : le dépôt de candidature à l'accréditation de l'immunosérologie (comprenant la sérologie de la toxoplasmose) et de la biologie de la toxoplasmose (biologie moléculaire et inoculation à l'animal) est programmé au 31 octobre 2012 et une accréditation des autres secteurs d'activités du laboratoire de parasitologie-mycologie au 31 octobre 2014.

La procédure de validation des méthodes appliquée au Pôle de Biologie prend en compte les préconisations du guide de validation des méthodes en biologie médicale, notamment i) pour la portée flexible standard : documentation bibliographique concernant la sensibilité et la spécificité et mise en oeuvre de tests de fidélité (répétabilité et reproductibilité) ; ii) pour la portée flexible étendue : en plus de

la documentation bibliographique, mise en oeuvre de tests de validation de la sensibilité, de la spécificité, de fidélité (répétabilité et reproductibilité), étude de l'influence et maîtrise des paramètres critiques, ainsi qu'approche de la justesse par exploitation des évaluations externes de la qualité s'il y a lieu. L'ensemble de ces procédures est en cours d'application.

Ainsi la démarche Qualité a conduit à mettre en place :

- Un système de signalement des non conformités avec suivi des actions menées en vue d'améliorer le fonctionnement du laboratoire
- Un nouveau contrôle de qualité externe qui s'ajoute à celui de l'AFSSAPS (rythme annuel) : contrôle européen (QCMD) pour le diagnostic de la toxoplasmose par biologie moléculaire.
- Une validation interne des méthodes est en cours selon les recommandations publiées dans le guide de validation en biologie médicale du COFRAC pour les analyses de la Toxoplasmose (Vidas G, M, avidité et Agglutination – ADHS ICM-ICA). Elle sera étendue aux analyses en Biologie Moléculaire.
- Un contrôle de qualité interne commercial journalier pour les techniques ELISA (Vidas G)
- Un contrôle de qualité interne pour l'ADHS et deux contrôles de qualité internes pour ICM-ICA .

Par ailleurs, le Laboratoire est déjà agréé pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose et dispose d'une animalerie agréée par les Services Vétérinaires.

Le Dr Foudrinier est également en charge de l'assurance qualité du CRB Toxoplasma dont la localisation est double (Reims et Limoges/Pôle Souches), le CRB Toxoplasma a été certifié le 12/01/2010 selon le référentiel AFNOR NF 96-900 (suite à l'obtention d'un programme ANR dédié à la certification des CRB en France obtenu en 2006, I.Villena). La co-localisation de la banque à Reims et à Limoges renforce la sécurité de la conservation des échantillons, la réception des prélèvements, leur mise en cryobanque font l'objet de procédures écrites selon le référentiel AFNOR. Le transport des prélèvements est assuré par un transporteur agréé. Cette démarche de certification a été accompagnée par un ingénieur qualité déléguée par l'INSERM. En outre, le CRB Toxoplasma a intégré le réseau européen des CRB (BBMRI) et bénéficie du label IBISA. Etant donné l'intrication étroite entre les activités de CRB Toxoplasma et du Pôle Souches du CNR Toxoplasmose, cette démarche qualité du CRB retentit sur le niveau de qualité du CNR. Ainsi, pour le Laboratoire du Pôle Souches, cette démarche a été l'occasion de remettre en ordre la banque de souches mais aussi celle des extraits d'ADN toxoplasmiques, avec notamment une dénomination anonymisée des différents prélèvements.

F-2 Le Laboratoire Associé Pôle Souches

Le Laboratoire du Pôle Souches est engagé dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 1589 pour la biologie médicale. Le calendrier prévisionnel de la démarche d'accréditation inclut l'accréditation du Pôle Souches du CNR. Elle devra être facilitée par la certification selon le référentiel AFNOR NF 96-900 obtenu en 2010 pour le CRB Toxoplasma accolé au Pôle Souches.

F-3 Le Laboratoire Associé Pôle Sérologie

Le Pôle de biologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg regroupe l'ensemble des laboratoires de biologie médicale (14 laboratoires).

Pour assurer sa démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189, conformément aux obligations faites aux laboratoires d'analyses, le Pôle de biologie dispose d'un groupe de travail associant tous les biologistes responsables de la qualité et les cadres de santé. Ce Groupe Qualité du Pôle de Biologie est dirigé par un biologiste. Il est assisté de 2 ingénieurs qualité constituant le bureau de ce groupe.

Le Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale associé à la Bactériologie, l'Hygiène Hospitalière et la Virologie forment le Plateau Technique de Microbiologie. Au sein de cette structure, le groupe de travail qualité est constitué des responsables qualité de chaque composante, des cadres de santé et de 2 techniciens qualifiés en qualité.

Le Laboratoire de parasitologie et de mycologie médicale est engagé dans une démarche d'accréditation pour ses pratiques analytiques. Le « diagnostic biologique de la toxoplasmose » est une portée d'accréditation privilégiée avec mise en place de groupes de pilotage pré et post analytique, analytique, hygiène /sécurité, informatique, métrologie, commandes et ressources humaines. Les phases pré et post analytiques sont finalisées.

Les trois biologistes de sérologie assistés des techniciens ont initié la démarche qualité qui a conduit à mettre en place :

- Un système de signalement des non conformités et réclamations avec suivi des actions menées en vue d'améliorer le fonctionnement du laboratoire et de répondre aux attentes des clients.
- Des contrôles de qualité externe qui s'ajoutent à celui de l'AFSSAPS (une fois par an en moyenne) : i) UK National External Quality Assessment Service For Microbiology (London) (3 fois par an) et ii) Centre Toulousain pour le Contrôle de la qualité en Biologie (CTCB) (3 fois par an)
- Une validation des méthodes, pour chaque analyse employée au sein du laboratoire, selon les recommandations publiées dans le guide de validation en biologie médicale du COFRAC.
- Un contrôle de qualité interne commercial journalier pour les techniques ELISA , immunofluorescence et ELISA IgG avidité.
- Un suivi de la mise en place de ces pratiques est effectué par le biais d'audits internes et externes réguliers.

Le laboratoire élabore et évalue des réactifs employés pour la mise au point de techniques utilisant des réactifs de diagnostic *in vitro* dans le cadre de contrat de collaboration entre l'industrie et l'université.

F-4 Le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire

Le Laboratoire a commencé la mise en place du GBEA en 1998. Il a mis en route un système de management de la Qualité dès 2006, avec une déclaration de Politique Qualité début 2007. Des réunions Qualité ont lieu mensuellement entre tous les biologistes du laboratoire le RQ Biologiste et la Direction. Le laboratoire est globalement engagé dans une démarche d'accréditation. L'ensemble du personnel du Laboratoire est sensibilisé et travaille à la démarche Qualité à son niveau et dans son domaine. Des réunions ont lieu sur un rythme mensuel à bimestriel selon la catégorie de personnel concernée. Un "diagnostic Qualité" effectué en mars 2011 s'est révélé très positif pour l'ensemble de la Démarche. Le diagnostic moléculaire sera proposé à l'accréditation dès 2013. Toutefois, le calendrier prévisionnel de la procédure d'accréditation n'est pas établi. Le secteur "pilote" pour tous les axes Qualité du Laboratoire est le secteur de Biologie Moléculaire. Ce dernier a une réunion Qualité (avec suivi des actions d'amélioration) réunissant tous les acteurs concernés sur un rythme trimestriel. Il participe à un contrôle de Qualité externe européen (QCMD) une fois par an. Il organise lui-même le CQE national dans ce domaine, auquel il participe de façon objective et anonymisée. Le diagnostic moléculaire sera proposé à l'accréditation dès 2013.

Par ailleurs, le Laboratoire-Support de Toulouse a reçu l'Accréditation COFRAC depuis Septembre 2006 (numéro 1-1769), pour :

- les techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic de la Toxoplasmose
- la recherche d'ADN parasitaire par PCR.

Ce laboratoire membre du CNR (Laboratoire Support dans deux Pôles) va mettre en 2011, par l'intermédiaire de son RAQ (Dr C. Roques), à disposition ses procédures et référentiels qualité et piloter un groupe de travail comprenant des membres des Laboratoires Coordonnateur et Associés ainsi que des membres du réseau du CNR. Cette disposition permettra une avancée plus rapide de la démarche d'accréditation obligatoire à l'horizon 2016.

G - DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

Site Internet du CNR

Un site Internet a été créé dès 2007 par le Laboratoire Coordonnateur (<http://www.chu-reims.fr/CNRtoxoplasmose>), il est commun à l'ensemble des Laboratoires Associés du CNR Toxoplasmose. Ce site est hébergé par le CHU de Reims et la maintenance est assurée par la direction des services informatiques (DSIT) avec sécurisation des données. Ce site assure la présentation du CNR (organigramme, missions), la diffusion de documents validés par les membres du réseau du CNR (guides d'interprétation), les Rapports annuels d'activités sont mis en ligne sur le site Internet une fois validés par l'InVS. Pour répondre à une demande de nombreux laboratoires d'analyses français ou de professionnels de santé (gynécologues obstétriciens en particulier), une liste des laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose a été mise sur le site Internet. Cette liste présente les laboratoires experts pour le diagnostic de la toxoplasmose mentionnant les correspondants médicaux, les diagnostics pratiqués avec les spécificités techniques pour les méthodes immunologiques pratiquées au sein de chacun des laboratoires.

Le site permet également la notification directe en ligne des cas de toxoplasmose congénitale par les laboratoires du réseau Toxosurv, ceci se fait via un logiciel de saisie (ToxoSurv, Voozadoo) avec accès réservé. La vérification des données saisies, l'extraction et l'analyse de la base de données sont réalisés par C. Delmas, I. Villena et T. Ancelle (Pôle Epidémiologie). L'analyse des données via le logiciel STATA (Société Ritme Informatique) permet de réaliser une analyse détaillée de la surveillance des toxoplasmoses congénitales. Des résultats partiels du Plan d'Analyse Toxosurv sont diffusés via le site Internet (Annexe 4).

Le système de surveillance pour la toxoplasmose congénitale mis en place par le Laboratoire Coordonnateur prévoit dans sa structuration des relances périodiques par voie de mail ou courriers. Ces envois ainsi que leurs réponses sont tracés. Une adresse mail toxosurv@chu-reims.fr est à la disposition de tous les membres pour toutes questions relatives à la notification des cas de toxoplasmoses congénitales, elle est consultable simultanément au CHU de Reims par le Coordonnateur du CNR (I.Villena), l'ARC (C. Delmas) et T. Ancelle du Pôle Epidémiologie (CHU Cochin) permettant ainsi une réponse rapide. L'ensemble des mails est tracé et conservé par le Laboratoire Coordonnateur.

Le site Internet du CNR offre un lien avec le site Internet du Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma* (<http://www.crb.toxo.com>) créé en 2008 et en lien avec le Pôle Souches et géré par le CHU de Reims. Ce site permet une présentation du CRB et de son organisation, la présentation du catalogue des souches disponibles pour la communauté scientifique et assure la mise à disposition des souches via les documents de demandes disponibles en ligne. Ce site présente deux versions française et anglaise pour une large diffusion de l'information.

Le site Internet du CNR offre un lien avec le site de l'InVS. De même, un lien doit être établi avec les sites des Laboratoires Associés.

Pour la prochaine mandature, il est prévu de créer un espace réservé aux professionnels de santé pour mise en ligne de documents spécialisés à visée professionnelle.

Système de surveillance pour la toxoplasmose congénitale

La capacité du candidat à mettre en œuvre la transmission régulière et automatisée de données vers l'InVS sera décrite :

Un logiciel de saisie (ToxoSurv, Voozadoo) des cas de toxoplasmose congénitale a été élaboré par la Société Epiconcept (S. Becquerel, G. Desve) en collaboration avec le CNR Pôle Epidémiologie (C. Delmas, I. Villena, CHU Reims et T. Ancelle, CHU Cochin) et l'InVS (V. Goulet et L. King du DMI).

Voozadoo, de part sa modularité, son ouverture et les technologies utilisées permet l'extraction et la transmission de données ou la mise à disposition de données sous les formes suivantes :

- En ligne : Transmission via Voozadoo, l'InVS peut avoir accès à des informations agrégées via un compte dédié et sécurisé. La sécurisation des transferts est assurée par le serveur Web (protocole https).

- Extraction de données agrégées ou de fichiers à plat anonymisés (Feuilles excel, fichier texte, pdf..).

Le niveau de sécurisation des transferts dépend de la nature des données (individuelles ou agrégées).

- Intéropérabilité / Web services : Les technologies utilisées dans Voozanoo (en particulier l'exploitation native de fichiers Xml) permettent une mise en place naturelle d'interfaces pour un transfert automatique et sécurisé de données standardisées.

(Ce type d'architecture correspond à celle mise en place pour les échanges avec l'ECDC pour alimenter la base TESSy - cf machine to machine interface to TESSy

www.ecdc.europa.eu/.../0907_TER_TESSy_Web_Service_Technical_Documentation_1.pdf)

Le laboratoire détaillera les procédures visant au respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractères personnel ou les évolutions prévues.

Système Voozanoo géré par la Société Epiconcept :

- Authentification : Nativement l'authentification est individuelle (personne physique) et elle s'effectue par le biais de la saisie d'un identifiant et d'un mot de passe associé. En fonction des infrastructures, elle peut être renforcée par l'utilisation d'un LDAP (Système d'annuaire centralisé). Une interface d'administration permet à l'administrateur de gérer l'ensemble des utilisateurs (révocation, changement de mot de passe, création...). Ces administrateurs sont C Delmas, T. Ancelle et I. Villena. Les droits d'accès sont définis par les administrateurs qui enregistrent les laboratoires participants au réseau ToxoSurv dans la base.

- Droits des utilisateurs / Restriction des accès : Une interface dédiée permet l'association d'actions et de droits à des groupes d'utilisateurs (personnel administratif, technicien, biologiste, administrateurs...). Les utilisateurs sont les centres du réseau « Toxosurv ». Ils ne visualisent et n'accèdent qu'à leurs données (cas qu'ils ont notifiés) et visualisent les dossiers partagés (deux déclarants différents pour un même cas notifié en période anténatale et postnatale).

- Traçabilité assurée par Voozanoo, Epiconcept avec :

Journalisation des accès

Traçabilité de toutes les actions sur la base de données du type (QUI/QUOI/QUAND)

Traçabilité des modifications effectuées sur le logiciel et les ressources (versionning).

- La maintenance du logiciel (Toxosurv, Voozanoo) permet d'assurer la continuité du logiciel et de réaliser des améliorations du système, elle est assurée par la société Epiconcept en lien avec la direction des services informatiques du CHU de Reims qui assure la sécurisation du logiciel. Les frais de cette maintenance sont réglés par le Laboratoire Coordonnateur sur les budgets de CNR alloués par l'InVS, les frais d'hébergement du site et du logiciel sont pris en charge par le CHU de Reims.

Procédures gérées par le CNR de la Toxoplasmose:

La notification des cas de toxoplasmose congénitale se fait de façon anonymisée (via logiciel d'anonymisation fourni par l'InVS à tous les laboratoires participants). Le projet de traitement automatisé de données nominatives relatif à l'étude intitulée « Mise en place d'un système de surveillance pour la toxoplasmose » adressé le 5 octobre 2006 à la CNIL, a reçu un avis favorable du Comité consultatif le 14 novembre 2006 et la CNIL a donné son autorisation pour la mise en œuvre de ce traitement de données le 03 mai 2007 (Autorisation délivrée au CHU de Reims, N° 907020). Une note d'information est remise à la patiente par le médecin prescripteur des tests ayant permis de poser le diagnostic de toxoplasmose congénitale (Annexe 5).

Au CHU de Reims, les données sont protégées de la façon suivante :

- l'accès à Voozanoo se fait en https (il n'est donc pas possible d'intercepter la communication entre le navigateur du déclarant et le serveur pour en visualiser le contenu),

- Voozanoo gère des utilisateurs et mot de passe,

- les données sur le serveur ne sont accessibles qu'aux administrateurs des serveurs du CHU (personnel de la DSIT soumis aux règles de déontologie et de respect de la confidentialité),

- les journaux d'accès à Voozanoo sont stockés sur le serveur Web du CHU qui l'héberge, et permettent de retrouver l'adresse IP, la date et l'heure de l'accès à une URL de Voozanoo,

- les données sont sauvegardées quotidiennement par les robots de sauvegarde du CHU, avec remontée d'alerte si la sauvegarde n'a pas fonctionné.

Le Référent de la DSIT pour le logiciel Voozanoo est C. Pennaforte.

H. PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2012-2016.

H- 1 Expertise

H-1.1 Techniques de détection et d'identification des agents en développement

Laboratoire Associé Pôle Souches

Au cours des années 2006-2010, la technique de caractérisation génétique est devenue de plus en plus discriminante (PCR Multiplex 15 MS) permettant des traçages individuels des isolats et des possibilités d'études de génétique des populations. L'étape suivante ira dans le sens d'une meilleure classification en groupes de ces isolats, grâce à nos travaux basés sur les microsatellites et à une collaboration en cours avec des équipes américaines utilisant d'autres outils (PCR-RFLP, séquençage). Ce consensus sur la nomenclature (perspective 2012) permettra de clarifier la relation entre les génotypes et diverses caractéristiques cliniques et biologiques.

Le séquençage complet du génome d'une cinquantaine de souches représentatives de la diversité (projet NIH, USA, auquel le CRB *Toxoplasma* est associé), devrait faciliter la recherche de gènes de virulence. Le séquençage de ces gènes de virulence sera développé au CNR de la Toxoplasmose (perspective 2013 et au-delà).

H-1.2 Stockage des collections

Laboratoire Associé Pôle Souches et CRB Toxoplasma, associé au CNR Laboratoire Coordonnateur et Pôle Epidémiologie

Le stockage des collections de souches se fait dans le cadre du CRB *Toxoplasma* dont nous chercherons à maintenir la certification obtenue en 2010. Pour des raisons de sécurité de la banque, ce stockage est assuré sur 2 sites, celui de Reims et celui de Limoges. En pratique, il s'est avéré difficile d'avoir sur chaque site la totalité de la collection (en raison souvent d'isolats pauvres ne permettant pas un envoi sur l'autre site). Ce sera un des objectifs de la période 2012-2016. Une meilleure cohérence entre les 2 sites sera assurée par le développement d'un logiciel spécifique aux CRB micro-organismes (projet en cours de réalisation piloté par l'Institut Pasteur sur programme IBISA, perspective de développement 2012) associé à des systèmes informatiques permettant la communication entre les sites.

H-1.3 Travaux d'évaluation de techniques ou de pratiques envisagés

Laboratoire Associé Pôle Sérologie

Problématique et besoin :

La sérologie de la toxoplasmose permet un dépistage des femmes à risque, un diagnostic précoce de la primo-infection et de l'infection congénitale. En France 50% des femmes sont séronégatives lors d'une grossesse et bénéficient d'un suivi sérologique dans le cadre du programme de prévention nationale de la toxoplasmose congénitale. En théorie il est donc effectué près de 2 millions de sérologies par an pour un coût annuel estimé s'élevant à 32 millions d'euros. En raison du caractère asymptomatique de la primo-infection chez la mère et de la gravité potentielle en cas de transmission materno-fœtale du parasite, les rôles du médecin et du biologiste sont essentiels pour :

1. Dépister sérologiquement les femmes non immunes (et donc susceptibles d'être contaminées) et affirmer sérologiquement l'immunité des patientes qu'il sera inutile de suivre pendant la grossesse.
2. Diagnostiquer précocement une primo-infection survenant en cours de grossesse
3. Rechercher l'atteinte fœtale en cas de primo-infection maternelle en cours de grossesse.
4. Traiter précocement l'infection maternelle, fœtale et néonatale

Si ce schéma est simple, il n'en va pas de même pour la mise en œuvre de ses modalités biologiques de dépistage ou de diagnostic sérologique.

Le mandat précédent, grâce au groupe de travail des Laboratoires Supports et aux membres du réseau, a permis de clarifier certains points, entre autres ceux liés aux problèmes d'interprétation des résultats sérologiques dans les cas les plus simples (voir le bilan 2006-2010) et de mettre en œuvre une politique d'évaluation et d'expertise de réactifs commerciaux. Il reste un certain nombre de questions auxquelles le Pôle Sérologie doit répondre.

En effet, la sérologie de la toxoplasmose, pratiquée dans le cadre du dépistage, doit répondre à plusieurs contraintes. La première est imposée par la nomenclature, avec la réalisation de deux techniques différentes décelant des anticorps d'isotypes différents (en pratique les IgG et les IgM) et la nécessité de rendre les résultats du titrage des anticorps IgG en Unités Internationales (UI). L'utilisation des UI est, certes, une obligation pour le dosage des IgG toxoplasmiques mais elle n'assure qu'une comparaison très imparfaite entre les résultats obtenus par des techniques différentes dans la mesure où les antigènes employés sont différents. Un large panel de techniques commercialisées peut répondre plus ou moins à ces contraintes, sans pour autant qu'une documentation indépendante puisse à l'heure actuelle renseigner utilement l'utilisateur final.

Il nous reste donc à déterminer de façon indépendante pour chaque technique:

1. La spécificité de façon à ne pas considérer à tort des femmes non immunisées comme étant immunisées (risque de faux positif)
2. La sensibilité et la capacité à dépister précocement une séroconversion
3. La faisabilité dans la pratique quotidienne, variable en fonction de la taille du laboratoire et de son équipement.

L'absence de standardisation et la très grande disparité des techniques aboutit à des difficultés d'interprétation des résultats sérologiques. Le guide d'interprétation issu du mandat quinquennal précédent a permis de clarifier certains aspects de cette question. Mais il reste un certain nombre de points à clarifier :

- Quelle est la place définitive dans l'algorithme des choix techniques de nouvelles méthodes comme l'avidité, l'immuno-empreinte de confirmation, ou les tests de compétition?
- Quel est le rôle des UI en fonction des sérums étalons nationaux et internationaux au regard de la nature extrêmement variable des antigènes employés dans les réactifs du commerce?
- Comment standardiser l'interprétation des résultats du diagnostic immunologique en l'adaptant à chaque cas clinique particulier (la femme enceinte, le nouveau-né, l'immunodéprimé, la toxoplasmose oculaire) ? Il existe encore de larges différences en termes de prises de décisions tant du point de vue de l'interprétation que du choix des techniques les plus appropriées en fonction du patient.
- Comment placer le diagnostic immunologique parmi les autres techniques de diagnostic biologique en fonction des situations cliniques ?

Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire

Problématique et besoin :

Introduit relativement récemment dans les années 1990, le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose a profondément amélioré le diagnostic de cette infection, aussi bien pour la toxoplasmose congénitale (TC) que chez l'immunodéprimé. Pour ce qui concerne la TC, il a permis d'augmenter la sensibilité du diagnostic prénatal, d'améliorer le rendu des résultats et la prise en charge des patientes (rendu en quelques jours au lieu de 4-6 semaines avec l'inoculation à la souris), et de grandement simplifier le geste diagnostique, diminuant ainsi le risque de perte fœtale de moitié. Chez l'immunodéprimé, malgré des performances moins notables, il a tout simplement révolutionné le diagnostic, faisant passer la sensibilité d'un taux extrêmement bas avec l'examen direct ou la culture *in vitro* à environ 60 % dans la toxoplasmose cérébrale et 100 % dans la toxoplasmose disséminée. Par ailleurs, le diagnostic moléculaire constitue aujourd'hui, de fait, le socle de base sur lequel s'appuient (directement ou indirectement) quasiment toutes les études sur la toxoplasmose congénitale : épidémiologie, typage, polymorphisme génétique des souches, évaluation des thérapeutiques etc. Or, de l'ensemble des thématiques relatives à cette maladie, il constitue sans doute, et paradoxalement, la facette la moins robuste et la plus sujette à questions.

En effet, le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose souffre de deux caractéristiques majeures : la nécessité d'une sensibilité extrêmement élevée (couplée à une parfaite spécificité) ; et le fait que la PCR-*Toxoplasma* reste une méthode dite "maison" (ou "artisanale") dont les performances varient forcément en fonction des centres, et ce malgré l'arrivée en force de la PCR en temps réel depuis 7-10 ans (Costa et al 2000, Lin et al 2000, Reischl et al 2003, Romand et al, 2004, Sterkers et al. 2009). L'absence de centralisation, alliée à la nature même des technologies nouvelles (que ce soit au départ pour la PCR conventionnelle ou depuis le milieu des années 2000, pour la PCR en temps réel) a eu pour conséquence le développement de nombreuses méthodes pour ce diagnostic, et donc une très grande diversité des méthodes utilisées (Sterkers et al. 2009).

Cette dernière a plusieurs corollaires néfastes : (i) variabilité des performances de la PCR, donc du

rendu des résultats (Sterkers et al. 2010, Bastien et al. 2008, Beld et al. 2007¹) ; (ii) difficultés à évaluer la valeur des différentes méthodes utilisées en se basant sur les résultats de sensibilité annoncée, sans moyen référent d'évaluation ; (iii) ralentissement de la diffusion des méthodes entre laboratoires et donc de l'homogénéisation ("standardisation") éventuelle de ce diagnostic : (iv) impossibilité de comparer les résultats obtenus par chaque groupe, donc de réaliser des études comparatives multicentriques rigoureuses (critique généralement émise pour les études menées dans le cadre de l'EMSCOT "*European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis*"). A cette diversité des méthodes s'est surajoutée une grande diversité des pratiques à la fois pré-analytiques et analytiques. Ces variations persistent après l'introduction de la PCR en temps réel.

A partir de 2002, le problème du manque de consensus a été pris en compte par l'association des hospitalo-universitaires en Parasitologie-Mycologie "ANOFEL", qui a soutenu la mise en place, par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Montpellier, d'un Contrôle de Qualité national en PCR-*Toxoplasma*; puis la création en 2006 du CNR de la Toxoplasmose avec la nomination du Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire a permis des progrès notables dans le domaine (voir chapitre D bilan).

La mission principale de ce Laboratoire Associé (LA) se situe dans le domaine de l'expertise du diagnostic moléculaire. La constitution d'un groupe de travail (GdT) composé d'un nombre relativement important de centres (Laboratoires Supports, LS) a fait ses preuves au cours du mandat quinquennal précédent. Elle est indispensable pour prendre en compte la diversité des méthodes "maison" existant en France actuellement. Elle doit permettre de diffuser les compétences à l'ensemble de la communauté concernée par ce diagnostic, plus aisément que partant d'un seul laboratoire expert. Ce GdT d'experts s'appuie sur le réseau des laboratoires hospitaliers membres du CNR, impliqués dans le diagnostic de la toxoplasmose. Cette structuration est essentielle pour le partage de l'expertise et la réalisation future d'études multicentriques nationales.

L'objectif général de ces missions d'expertise reste l'amélioration globale et la "standardisation" du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en France.

Objectifs de travail 2012-2016 :

- 1) Contribuer au développement, à l'évaluation et à l'homogénéisation ("standardisation") des pratiques et méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose.
- 2) Améliorer globalement les performances du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en France, d'une part en diagnostic prénatal et néonatal, d'autre part chez l'immunodéprimé.

Ces objectifs se déclinent en différents travaux :

- (i) fabrication et distribution de matériel biologique dit "étalon" (ADN, témoins positifs, gammes, échantillons artificiels) destiné à être envoyé (a) en priorité aux membres du groupe de travail en vue de l'évaluation et de la standardisation du diagnostic moléculaire; (b) dans un second temps aux membres du réseau du CNR avec le même objectif; (c) plus généralement aux biologistes désireux d'améliorer ou de mettre en place ce diagnostic moléculaire ;
- (ii) participation à l'évaluation des pratiques et méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en France ;
- (iii) contribution au développement et à l'amélioration des techniques de détection moléculaire, en particulier au moyen d'études comparatives des pratiques, des techniques et des méthodologies ;
- (iv) participation à l'objectif d'amélioration globale et de "standardisation" du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en France.

1. Fabrication et distribution de "ressources" de matériel biologique

La constitution de "ressources" de matériel biologique destiné à l'auto-évaluation et à l'amélioration des pratiques de diagnostic moléculaire en toxoplasmose en France a largement progressé au cours du mandat quinquennal précédent ; elle reste une pièce angulaire de l'ensemble de ce projet et beaucoup reste à faire. Ces différentes formes de "ressources" seront conçues dès le départ en quantité suffisante pour faire l'objet de plusieurs envois, d'abord aux LS puis à l'ensemble du réseau des membres du

¹ Beld, M. et al. (2007) Experts Roundtable: Real-Time PCR and Microbiology. *In*: Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization (ed. A. Ian M. Mackay). Caister Academic Press

CNR.

a) Matériel parasitaire "étalon"

Le LA peut aujourd'hui créer (dans des conditions formalisées et normées), lyophiliser, stocker et distribuer des échantillons artificiels faits de suspensions de toxoplasmes dans du liquide amniotique, à des concentrations définies en fonction des besoins des utilisateurs et de l'objectif poursuivi.

Il devient indispensable d'élargir la matrice d'échantillons aux autres milieux biologiques les plus fréquemment rencontrés dans le diagnostic des toxoplasmoses et, donc, de reproduire un tel matériel parasitaire à partir de sang total, de couche leucocyto-plaquettaire, voire de placenta. Cette étape est plus délicate que la première mais bénéficiera du savoir-faire acquis dans les 5 dernières années. Elle permettra d'aborder la question de l'homogénéisation des performances du diagnostic moléculaire de la toxoplasme à la naissance et chez l'immunodéprimé, au niveau national.

b) Gammes "standard"

A partir d'une ou de deux concentrations de ce matériel étalon, définies par le GdT au cours du mandat quinquennal précédent, des gammes de quantification sont proposées aux laboratoires intéressés, accompagnées de protocoles d'utilisation. Elles seront testées en 2011 et seront distribuées à l'échelon national dès 2012. Elles sont essentielles à une quantification à la fois correcte et surtout homogène sur le plan national. Celle-ci est une condition préalable indispensable pour pouvoir communiquer la quantification de la charge parasitaire aux cliniciens.

Dans un second temps, ces gammes seront également constituées avec le matériel étalon fait à partir de sang, en vue de la quantification des charges parasitaires chez le patient immunodéprimé.

c) Calibrateur externe de quantification

Des concentrations plus faibles que ci-dessus seront envoyées aux laboratoires intéressés afin de servir de "calibrateur externe" au quotidien. Ces échantillons seront également accompagnés de protocoles communs d'utilisation. Ils feront l'objet d'une extraction indépendante dans le laboratoire concerné, et auront pour objectif de re-calibrer de façon plus précise et plus réaliste (par rapport à la routine) les gammes de quantification mentionnées ci-dessus.

d) Témoins positifs d'inhibition de la PCR

De nombreuses molécules présentes dans les échantillons biologiques (surtout sanguins et tissulaires) peuvent conduire à une inhibition de la PCR. Celle-ci, si elle n'est pas détectée, peut entraîner le rendu de résultats faussement négatifs. La réflexion et les études entamées par le GdT en 2010-2011 sur ce sujet seront poursuivies ; à la suite de cela, les témoins positifs considérés comme les plus pertinents seront proposés au réseau comme témoins "standards".

2. Evaluation des performances des méthodes de diagnostic moléculaire

L'objectif d'homogénéiser ("standardiser") le diagnostic moléculaire de la toxoplasme en France requiert de proposer des moyens d'(auto-)évaluation objectifs, robustes, reproductibles, et acceptés par tous.

a) Le Contrôle de Qualité (CQ) national en Diagnostic moléculaire de la Toxoplasme, organisé par ce LA et placé depuis 2007 sous l'égide du CNR, remplit en grande partie ce rôle. Il est passé depuis 2010 à un niveau européen, de par l'apport de l'expertise scientifique de ce LA dans un CQ privé européen dédié au diagnostic moléculaire. Il fait aujourd'hui partie de l'activité obligée de tous les centres nationaux concernés par ce diagnostic.

Il doit aujourd'hui évoluer de plusieurs façons :

- passer de la souche RH modèle de laboratoire à des souches de type II, les plus communément rencontrées en France au cours de la grossesse, et à quelques souches dites "atypiques", également rencontrées dans les infections congénitales ; cette étape se fera en collaboration avec le LA "Pôle Souches".

- inclure des matrices plus complexes visant à évaluer également le diagnostic néonatal et le diagnostic chez l'immunodéprimé; cette étape sera conditionnée par le succès de la préparation des échantillons artificiels mentionnés au point 1.a) utilisant sang, couche leucocyto-plaquettaire et placenta.

b) D'autres évaluations seront mises en place, de façon moins formelle et plus personnalisée, basées sur les différentes formes de matériel parasitaire "standard" mentionnées au point 1.a). Des concentrations définies, accompagnées d'un protocole précis, seront envoyées sur demande aux utilisateurs et les résultats discutés avec le LA. Le cas échéant, des pistes d'amélioration possibles ensuite suggérées, tenant compte des valeurs considérées comme "seuils" définies par le GdT au cours du mandat quinquennal précédent (également susceptibles d'évoluer).

3. Etudes comparatives

L'un des objectifs de ce pôle est de susciter et organiser des études sur la comparaison de méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose.

Ces études doivent être (i) d'une part "intra-centre", afin d'éviter les biais très importants liés à la diversité des méthodes (réactifs, appareils, mises au points...) qui existent inévitablement dans une étude inter-laboratoires ; (ii) d'autre part multicentriques afin au contraire de valider les résultats en tenant compte des différences existant entre les méthodes.

Ces études sont réalisées dans des laboratoires "référents", de préférence au sein des LS "Biologie Moléculaire", et sont analysées au sein de ce même groupe de travail dans un climat de confiance et de confidentialité.

3.1. Comparaison de méthodes de PCR

Dans ce programme quinquennal, l'accent sera mis sur les tests des trousse commerciales de PCR-*Toxoplasma* récemment mises sur le marché. En effet, une dizaine de ces trousse ont fait leur apparition dans les deux dernières années. La comparaison de deux d'entre elles avec les méthodes "maison" du GdT ont mis en évidence la très mauvaise qualité de l'une (Morelle et al., manuscrit en préparation) et au contraire les bonnes performances de l'autre (Filisetti et al., manuscrit en préparation). L'un des rôles essentiels du CNR pourrait être de servir de guide à l'utilisation de ces trousse, en réalisant des études multicentriques mesurant leurs performances diagnostiques. La désignation par le CNR d'une ou de plusieurs méthodes commerciales de référence serait en effet le meilleur moyen d'accélérer (1) la démarche vers l'accréditation et (2) la standardisation de ce diagnostic moléculaire, sans perdre pour autant en qualité de résultat.

Un autre point important concerne la comparaison des méthodes de révélation par sonde "TaqMan" versus sondes "FRET"; ces deux méthodes de révélation en PCR en temps réel, les plus utilisées, ne donnent peut-être pas la même sensibilité analytique.

3.2. Comparaison de méthodes d'extraction d'ADN

Une seule étude comparative de méthodes d'extraction (Yera *et al.*, J. Clin. Microbiol. 2009) a eu lieu au cours du précédent mandat quinquennal, en raison de la lourdeur d'une telle étude en multicentrique. Ces études restent cependant indispensables.

Elles doivent être réalisées par plusieurs centres, d'une part pour évaluer chaque méthode d'extraction avec différentes méthodes de PCR, d'autre part en raison de la lourdeur de l'étude. Elles utiliseront le matériel standard mentionné au point 1.a). Elles devront (i) inclure des méthodes d'extraction manuelles et automatisées, et (ii) utiliser si possible différentes matrices biologiques.

3.3. Influence de la méthode d'extraction sur la performance de la PCR

Au cours du mandat quinquennal précédent, il est apparu clairement que la méthode d'extraction n'est pas seulement importante par sa performance intrinsèque, mais qu'elle doit être adaptée ("optimisée") à la méthode de PCR utilisée. Ainsi, telle méthode d'extraction pourra paraître performante avec une PCR mais mauvaise avec une autre. Le LA "Pôle Biologie moléculaire" souhaite explorer cette inter-relation dans le "couple" extraction-PCR. Cette étude se fera en parallèle avec la précédente.

Elle est importante dans la mesure où elle permettra d'établir des recommandations techniques ciblées en fonction de la méthode de PCR utilisée.

3.4. Comparaison de pratiques pré-analytiques et analytiques

L'état des lieux réalisé en 2007-2008 a mis en évidence une diversité des pratiques pré-analytiques et analytiques dans le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose.

4. Participation à l'amélioration et à la "standardisation" du diagnostic moléculaire

Nous préférons le terme d'homogénéisation à celui de "standardisation". En effet, au cours du précédent mandat quinquennal, nous avons remplacé l'objectif (inatteignable) de "standardisation" des méthodes à celui plus réaliste d'homogénéisation des performances des différentes méthodes. Cet objectif, au niveau national, est indissociable de celui d'évaluation des méthodes exposé plus haut (point 2).

4.1. Homogénéisation des performances des méthodes

Malgré la mise en place du CQ national, des différences de performances persistent entre les centres, et même au sein du GdT (Sterkers *et al.*, J. Clin. Microbiol. 2010). La nécessité d'une sensibilité élevée a été soulignée dans le chapitre "Etat de la question". L'évaluation des performances se fait donc sur des valeurs de concentrations en Toxoplasmes faibles.

Un "seuil" minimal de sensibilité a été fixé par consensus dans ce même GdT en 2010. Il doit maintenant être étendu à l'ensemble de la communauté nationale. Pour cela, des échantillons de matériel "étalon" seront proposés sous forme codée aux différents centres de diagnostic, afin que eux-mêmes établissent une gamme après extraction par leur propre méthode, et déterminent leur seuil. En cas de faible performance, des conseils seront prodigués aux centres qui en feront la demande.

Toutefois, le seuil fixé en 2010 n'est pas tout à fait satisfaisant : (i) il a été défini à 0,5 génomes de parasite, mais, pour des raisons techniques, par prise d'essai et non en parasites par mL. ; (ii) il pourrait en réalité s'avérer trop élevé.

En conséquence : (i) Le seuil actuel sera défini en Toxoplasmes /mL grâce à des expériences complémentaires communes à tous les LS. (ii) Un seuil plus fin sera travaillé avec le Gdt, puis à nouveau diffusé au niveau national. (iii) Le cas échéant, chaque participant devra "optimiser" sa méthode et/ou ses conditions de réaction d'amplification de façon à essayer d'atteindre le seuil consensus de détection observé au sein du GdT. Les centres utilisant une méthode moins performante devraient alors adopter une des méthodes les plus performantes. Les recommandations pourront être différentes selon le type d'équipement en temps réel utilisé (cf. *infra*).

Par ailleurs, une des études du LA a mis en évidence que la sensibilité de la PCR en temps réel dans les concentrations faibles est corrélée avec le Ct à 10^5 toxoplasmes /mL et l'efficacité; en d'autres termes, avec la valeur du Ct de ce point et l'efficacité d'un run de PCR, on doit pouvoir prédire mathématiquement le seuil de détection d'une méthode donnée, ce qui devrait faciliter l'interprétation et la communication avec les différents centres diagnostiques.

4.2. Homogénéisation des performances des pratiques pré-analytiques et analytiques

Une "relative" homogénéisation pourra être réalisée au moyen

- (i) des études comparatives citées ci-dessus
- (ii) des recommandations évoquées ci-dessous

4.3. Standardisation de la quantification par PCR en temps réel

Elle reste un des objectifs prioritaires du CNR.

L'un des problèmes majeurs constatés au cours du Contrôle national de Qualité est le manque de concordance entre les quantifications effectuées par différents laboratoires du réseau. Ceci pose problème en particulier parce que des pronostics et conduites à tenir peuvent être déduits par les cliniciens de ces dosages de charges parasitaires (Costa *et al.* 2001, Romand *et al.* 2004). Indépendamment de la méthode de PCR, ceci pose directement le problème de la gamme de référence témoin utilisée pour la quantification.

Les différents témoins actuellement utilisés feront l'objet d'évaluations comparatives en réseau dans plusieurs laboratoires du groupe de travail : ADN exogène (gène parasitaire ou humain), plasmide recombinant indépendant ou contenant une séquence de Toxoplasme, génome entier? Le mode de préparation/extraction de ce témoin devra rester celle du laboratoire participant, afin de garder la concordance propre au "couple" extraction-PCR. La quantité d'ADN témoin introduit par réaction devra également faire l'objet d'études comparatives.

Par ailleurs, la variation entre souches du nombre de répétitions des gènes-cibles actuellement utilisés doit continuer à faire l'objet d'une étude spécifique.

H-2. Surveillance épidémiologique

Nous continuerons à contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire selon les modalités suivantes :

H-2.1 Coordination d'un réseau de surveillance des toxoplasmoses congénitales

Basé sur un réseau de laboratoires (réseau Toxosurv) : cette mission est assurée par le Laboratoire Coordonnateur depuis 2006 en lien avec l'InVS. Nous poursuivrons lors du prochain contrat cette surveillance sous la même forme que celle actuellement mise en place : notification directe via le logiciel Toxosurv (Voozadoo, Epiconcept) hébergé par le site Internet du CNR pour les laboratoires spécialisés du réseau Toxosurv (n= 34) et notification par voie de fiches papier transmises au Laboratoire Coordonnateur qui les vérifie et les saisit dans la base pour les laboratoires du réseau Toxosurv diagnostiquant des cas de toxoplasmoses congénitales de façon occasionnelle (n= 16). En 2012, le Laboratoire Coordonnateur avec l'aide des Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie, conduira à nouveau une enquête auprès des LBM identifiés en 2006 pour savoir s'ils transmettent bien leurs cas suspects de toxoplasmoses congénitales vers les laboratoires spécialisés et auprès des laboratoires du réseau Toxosurv n'ayant jamais notifié de cas depuis 2006 pour en connaître les raisons (absence réelle de cas diagnostiqué ou transmission vers des laboratoires spécialisés pour confirmation du diagnostic qui est donc notifié par le laboratoire expert avec absence de notification de leur part). Ces enquêtes seront faites afin de s'assurer de l'exhaustivité du recueil. Les résultats de la surveillance des toxoplasmoses congénitales en France seront toujours discutées au sein du Comité de Pilotage « Toxosurv » établi par l'InVS et le CNR, ainsi qu'avec l'ensemble des laboratoires membres du réseau du CNR.

Avec le recul de 5 ans des données du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales ; le Laboratoire Coordonnateur aidé par les Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie évalueront les pratiques du diagnostic biologique de cette affection (valeur des différentes techniques proposées dans le diagnostic anténatal et postnatal de la toxoplasme congénitale). Cette évaluation permettra d'obtenir les sensibilités de chacune des analyses biologiques proposées et le poids respectif qu'elles occupent dans le diagnostic (analyses couramment ou peu pratiquées pour le diagnostic). Ceci pourra permettre d'émettre des recommandations quant à l'usage de ces pratiques diagnostiques. Ces résultats seront d'abord présentés et discutés avec les membres du CNR puis avec l'InVS (et le Comité de Pilotage « Toxosurv »).

H-2.2 Modalités de surveillance de la résistance aux traitements anti-toxoplasmiques

La mise au point d'un nouveau test d'étude de la chimiosensibilité est en cours par le Laboratoire Coordonnateur (voir partie C, capacités techniques du CNR et partie D Bilan sur ce point). Lorsque les valeurs de CI50 seront fixées par passage de 20 souches choisies dans le CRB Toxoplasma (programme de travail 2011), nous développerons une méthode de criblage de la chimiosensibilité à partir de 4 points de la gamme des concentrations en drogue entourant la valeur de sensibilité moyenne des souches. Les souches de génotype atypique ou celles avec données épidémiologiques particulières ou signes cliniques sévères seront ainsi testées (programme 2012-2016). En cas de résistance ou de valeur intermédiaire, la souche sera testée selon la méthode de référence et complétée par des techniques de mesure d'efflux de sonde (rhodamine et/ou calcéine-AM en présence ou non d'inhibiteurs) en cytométrie en flux pour repérer les souches avec efflux accru signant une potentielle résistance aux drogues testées (mécanisme passant par les ABC transporteurs de *T. gondii*).

H-2.3 Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés

Le Laboratoire Coordonnateur met à disposition ses moyens logistiques et les techniques biologiques nécessaires à l'investigation sur demande des Cire ou de l'InVS en cas de suspicion de cas groupés ou de TIAC. Le Laboratoire Coordonnateur peut mandater un ou plusieurs Laboratoires Supports ou membres du CNR pour participer aux investigations. D'autre part, les Laboratoires détectant des phénomènes inhabituels le signalent au Laboratoire Coordonnateur qui en informera l'InVS. Le Laboratoire Associé Pôle Souches est étroitement associé à ces investigations pour le génotypage des souches responsables de ces cas groupés.

H-2.4 Développement et l'animation de réseaux de partenaires

Le Laboratoire Coordonnateur continuera à animer le réseau des partenaires membres du CNR de la Toxoplasmose et le réseau Toxosurv en les sollicitant régulièrement (par voie de mail) pour les notifications des cas qu'ils diagnostiquent et pour leur transmettre les données de surveillance. Les réunions annuelles du réseau du CNR seront maintenues : ces réunions ont lieu à l'automne et permettent de présenter le bilan de l'année écoulée par les Laboratoires Coordonnateur et Associés, elles sont l'occasion de discussion et d'échanges entre les membres du CNR. Par ailleurs, les responsables des Laboratoires Coordonnateur et Associés proposent des réunions aux membres de leur pôle d'activités pour fixer les objectifs de travail et analyser les résultats obtenus.

Pour l'analyse des souches, les données géographiques associées aux souches a fait apparaître que certaines zones du territoire étaient encore peu couvertes (Laboratoire Associé Pôle Souches). Nous essaierons d'impliquer plus fortement les laboratoires correspondant à ces zones géographiques. Par ailleurs, vu les génotypes particuliers circulant dans les DOM-TOM, un accent particulier sera mis sur les relations avec les partenaires de ces régions en cherchant à établir de nouveaux contacts dans des territoires qui ne participent pas encore à l'envoi de prélèvements au CNR.

H-2.5 Contribution aux réseaux de surveillance européens

Il a été décidé avec l'InVS (V. Goulet du DMI) que le CNR (Laboratoire Coordonnateur) transmettrait les résultats du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales établi en France à l'ECDC pour intégration des données françaises aux données européennes qui ne représentent que des données parcellaires de surveillance. Le système de surveillance français avec recueil quasi-exhaustif des cas est unique en Europe et fournira ainsi des données pertinentes de surveillance de cette maladie. Les modalités de transmission des informations seront données par l'InVS (avec transmission probable avant l'été 2011 puis annuellement).

Il n'existe pas vraiment de réseau de surveillance européen dans le domaine de la toxoplasmose ni dans celui des souches de toxoplasme. Les chercheurs du Pôle Souches et du Pôle Epidémiologie collaborent avec des équipes européennes pour apporter leur expertise dans ce domaine.

H-2.6 Participation à des études épidémiologiques ou enquêtes concourant à la surveillance

Pour actualiser les données épidémiologiques de la toxoplasmose en France, le CNR pourra participer à des études sur demande spécifique de l'InVS, en mettant à disposition ses capacités techniques (études sérologiques par exemple).

En outre, le Laboratoire Coordonnateur avec l'aide des Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie, proposera une enquête ponctuelle à tous les laboratoires membres du CNR sur le recensement des toxoplasmoses diagnostiqués chez les patients immunodéprimés. Pour cela un questionnaire avec recueil des données épidémiologiques, des données du diagnostic clinique (toxoplasmose cérébrale, oculaire ou disséminée) et du diagnostic biologique, sera préalablement élaboré et soumis à l'InVS pour validation. Cette enquête visera à compléter les données du CepiDc-Inserm indiquant le nombre de décès annuel chez les patients atteints de SIDA avec toxoplasmose et les données recueillies dans le DMI2 (système d'information des centres d'information et de soins sur l'immunodéficience humaine) pour les sujets VIH positifs. Les tendances indiquent que l'incidence annuelle de la toxoplasmose cérébrale diminue de façon régulière depuis 1992 (incidence divisé par 11 de 1992 à 2001, source DMI2), elles méritent d'être actualisées au moins avec les données de l'ensemble des laboratoires membres du réseau du CNR.

Le Laboratoire Associé Pôle Souches contribuera à ces études en cherchant à récupérer les données cliniques d'évolution à 5 ans des toxoplasmoses congénitales pour lesquelles la souche a été génotypée. Ceci, couplé à des séquençages de gènes de virulence, devrait contribuer à affiner les

relations entre génotype et apparition de lésions rétinienne. Le but à terme est de disposer d'un outil (parmi d'autres) prédictif de l'évolution.

Par ailleurs, l'utilisation des outils d'analyse génétique spatialisée appliqués à la base de données des souches animales étudiées par typage microsatellites au Laboratoire Associé Pôle Souches permettra d'une part d'identifier l'origine géographique des souches humaines (notamment en cas de souches atypiques), d'autre part de contribuer à la connaissance des modes de contaminations en France. En effet, la structuration géographique de la distribution des souches permet d'imputer une origine locale à la contamination en particulier en zones rurales.

H-2.7 Réseau de partenaires et collaborations à renforcer

Il n'existe pas vraiment de réseau de surveillance européen dans le domaine de la toxoplasmose ni dans celui des souches de toxoplasme. Les membres du Pôle Souches collaborent avec des équipes internationales pour apporter leur expertise dans ce domaine (en 2009 : Turquie, Algérie, Pays-Bas, Finlande ; en 2010 : Tunisie, Danemark, Lettonie). Des collaborations en cours avec des biologistes brésiliens permettront de compléter les données sur la diversité des souches circulant sur le territoire sud-américain et donc, indirectement, de renforcer les connaissances sur les souches importées en Europe, soit par les voyages, soit par les aliments.

Les membres du Laboratoire Coordonnateur participent à des programmes européens de surveillance de la toxoplasmose (Programme Egide : 2009 avec la Roumanie, 2010 avec la Serbie). Ces programmes pourront être reconduits et les collaborations entamées poursuivies et élargies à d'autres partenaires pour une meilleure connaissance de la toxoplasme en Europe.

Renforcement de la collaboration avec les laboratoires experts en santé animale : en particulier avec le LNR chargé de la surveillance des parasites dans les aliments (Laboratoire ANSES LERPAZ, Pr P. Boireau, Maisons-Alfort) afin de mieux connaître l'épidémiologie de la toxoplasmose, la connaissance de la circulation du parasite chez les animaux est indispensable pour mieux comprendre les sources de contamination humaine et pour comparer les souches humaines et animales circulant en France (et pouvant provenir d'autres pays notamment importateurs de viandes). Le Laboratoire Coordonnateur a une partie de ses membres rattachés sous forme d'Unité Sous Contrat ANSES avec le LERPAZ permettant des travaux communs sur l'épidémiologie animale (voir travaux de recherche du Laboratoire Coordonnateur). Le LNR est en charge de développer des collaborations avec le réseau SAGIR pour la détection de *T. gondii* dans la faune sauvage et avec les Laboratoires Vétérinaires Départementaux pour la détection du parasite en particulier chez les petits ruminants (recherche des causes d'avortement dans les troupeaux) ; un transfert des techniques de détection doit être fait vers ces laboratoires. En cas d'isolement de souches, celles-ci pourront être génotypées par le Pôle Souches. Un transfert méthodologique sur les techniques moléculaires de détection est en cours entre le CNR et le LNR.

Par ailleurs dans la poursuite des plans de surveillance sur les viandes de boucherie élaborés lors du contrat précédent, il est prévu de demander (Laboratoire Coordonnateur en collaboration avec le LNR) à la DGAL de programmer des plans de surveillance dans la viande porcine (pour évaluer et comparer le portage parasitaire en France dans les élevages plein air et les élevages industriels) et un plan de contrôle de la viande de cheval (vu les alertes générées à propos de toxoplasmoses sévères suite à l'ingestion de viandes de cheval importées contaminées par des souches atypiques). Il faut souligner que l'European Food Safety Agency (EFSA, Agence européenne de sécurité sanitaire alimentaire) a demandé une surveillance accrue de l'infection chez l'animal (question N° EFSA Q 2007 038) notamment le mouton, le porc et le bovin. A cet effet, il est prévu une collaboration avec le LNR (Maisons-Alfort) qui proposera à ses partenaires européens un programme de surveillance des viandes ovines dans leur pays avec isolement et caractérisation de souches afin de mieux étayer les données épidémiologiques et les risques de contamination alimentaire encourus par les populations. Les Laboratoires Nationaux de Référence pour la surveillance de la trichinellose seront sollicités comme partenaires à ce projet.

H-3. Contribution à l'alerte

Les laboratoires du CNR qui repèreraient des cas groupés ou des phénomènes inhabituels (comme des cas avec tableau clinique grave ou souches ou ADN toxoplasmiques de génotype inhabituel de celui observé couramment en France) les signaleront à l'InVS via le Laboratoire Coordonnateur pour déclencher les investigations nécessaires (notamment enquête pour retrouver les sources de

contamination). Le Laboratoire Associé Pôle Souches pourra également lancer l'alerte via le Laboratoire Coordonnateur en cas de dérive des génotypes observés en France. Le Laboratoire Coordonnateur relayera l'alerte à tous les membres du CNR de la Toxoplasmose ainsi qu'aux laboratoires du réseau Toxosurv qui prennent part aux diagnostics de la toxoplasmose en France. Le cas échéant une information pourra être faite vers l'ensemble des LBM effectuant des analyses diagnostiques de la toxoplasmose.

Pour le diagnostic, le Pôle Sérologie notifiera les problèmes sérologiques en temps réel en collaboration étroite avec le système de réactovigilance de l'AFSSAPS.

H-4. Activités d'information, de formation et conseil

H-4.1 Projets de formation et conseils envisagés

Le Laboratoire Associé Pôle Sérologie apportera son expertise pour :

a. Conseil aux laboratoires de biologie médicale (LBM) dans le cadre du choix des techniques à mettre en œuvre en fonction de leurs besoins. De plus, les laboratoires du réseau se fixeront l'objectif d'une charte d'expertise des sérums à problème en identifiant les techniques permettant de résoudre chaque problème de façon spécifique. Ces guides méthodologiques seront dans la continuité du guide d'interprétation élaboré dans le cadre du programme précédent. Sur ces bases, il sera envisagé de créer un logiciel expert d'interprétation.

b. Formation par création d'un site d'autoformation par l'analyse de dossiers biocliniques virtuels et basé sur le logiciel expert. Il sera nécessaire d'intégrer cette formation dans les FMC validées par les sociétés savantes et les organismes spécifiques. Elle sera complémentaire des indispensables formations continues régionales effectuées par chaque membre du réseau directement auprès des LBM (voir Annexe 7 Enseignement-Formation).

c. Fabrication et distribution d'un Contrôle de Qualité Interne (IgG et IgM) pour le dosage des IgG et des IgM destiné à être fourni à l'ensemble des laboratoires participants au réseau du CNR.

H-4.2 Modalités de diffusion des conseils et informations aux professionnels de santé

Le développement du site Internet du CNR de la Toxoplasmose sera poursuivi par le Laboratoire Coordonnateur avec inclusion des travaux des Laboratoires Associés et projet de création au cours du prochain mandat d'un espace (ou d'un site) réservé aux professionnels de santé pour diffusion des conseils et informations pour le diagnostic et la prise en charge de la toxoplasmose chez les femmes enceintes, les nouveau-nés et les immunodéprimés (recommandations sur la pratique du diagnostic anténatal, guide d'interprétation des sérologies à problème...). Pour cela, une enquête sera menée auprès des LBM pratiquant la sérologie de la toxoplasmose pour leur proposer d'adhérer à un espace (ou un nouveau site) réservé nécessitant un accès protégé avec un code d'identification. Ces modalités seront étudiées par le Laboratoire Coordonnateur et les informaticiens du CHU de Reims en charge de la gestion du site Internet actuel.

Participation à la formation des professionnels de santé par l'intermédiaire du site Internet du CNR :

- Une page "Diagnostic Moléculaire de la Toxoplasmose" sera élaborée sur le site Internet du CNR. Elle attirera l'attention sur les difficultés et l'interprétation de ce diagnostic et fera le point sur la conduite à tenir recommandée en cas de diagnostic positif ou négatif. Ces recommandations concerneront en priorité le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, mais il est envisagé de les élargir à la toxoplasmose de l'immunodéprimé
- Les guides méthodologiques et documents destinés à une meilleure interprétation des sérologies rédigés par le Pôle Sérologie seront publiés sur le site Internet du CNR (guide d'interprétation déjà publié en 2011 sur le site).

Des informations destinées à un plus large public seront également à promouvoir sur le site.

H-4.3 Modalités de rétro-information aux partenaires du CNR de la Toxoplasmose

Les mêmes modalités que celles décrites dans la partie Bilan des activités (D-3.3.1) seront poursuivies avec:

- poursuite des réunions du réseau des membres du CNR (fréquence annuelle),
- envoi des rapports annuels d'activités, envois individuels des résultats de génotypage des souches et ADN adressés au Pôle Souches,
- envoi des résultats du contrôle de qualité en biologie moléculaire,
- envoi des plans d'analyse (résultats complets tels que ceux présentés en Annexe 3) du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales et des newsletters élargis aux membres du réseau « Toxosurv ». L'adresse mail réservée à ces membres pour toutes questions relatives à cette surveillance sera conservée avec la même réactivité de réponse (mail partagé entre T. Ancelle, C. Delmas, I. Villena).

Le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire procédera à une information aux partenaires du CNR de la Toxoplasmose sur les points d'expertise suivants :

Diffusion et mise à jour de l' "état des lieux" du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

L'état des lieux des pratiques et des méthodes réalisé en grand détail en 2007, à partir d'un questionnaire élaboré au sein du GdT, n'a pas été diffusé aux laboratoires membres du réseau du CNR en raison de l'extrême diversité observée entre les méthodes, et par conséquent de la complexité de l'analyse qui devait en être faite, et de la difficulté de pouvoir tirer des conclusions à partir de ces données. Toutefois, avec l'esprit d'ouverture et de transparence qui gagne le réseau du CNR, l'ensemble des participants a jugé utile que ces données soient divulguées (de façon restreinte), avec deux objectifs :

- permettre aux différents centres de prendre connaissance des autres centres qui réalisent des pratiques et méthode proche des leurs, en vue d'échanges éventuels.
- s'inspirer de pratiques / méthodes plus logiques ou connues comme plus performantes pour améliorer les leurs.

Ces données seront distribuées aux membres du réseau sous forme d'un long rapport synthétique et annoté.

Par ailleurs, cet état des lieux devra être maintenu à jour, grâce au questionnaire minimal accompagnant le Contrôle de Qualité national, et grâce à une autre enquête qui pourrait être programmée au milieu du prochain mandat quinquennal, après la diffusion des recommandations techniques.

Généralisation de l'homogénéisation des performances du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

L'évaluation des méthodes appliquée au sein du LA et des LS (décrites en H-1.3, point 2 du programme) sera généralisée à l'ensemble des laboratoires membres du réseau du CNR. Les résultats de cette phase seront incitatifs pour les autres laboratoires et permettront d'envisager une proposition d'homogénéisation des méthodes. L'expertise acquise par le LA et les LS au cours de la première phase en matière de mise au point et d'adaptation d'autres méthodes s'avèrera extrêmement utile pour l'ensemble des laboratoires hospitaliers.

Cette partie du programme de travail du LA devrait aboutir à une réduction du nombre de méthodes utilisées au profit des méthodes les plus performantes, et ainsi, à un début de standardisation au sein des laboratoires français concernés par le diagnostic moléculaire.

Recommandations et standardisation des pratiques du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

La rédaction de recommandations concernant le "Diagnostic Moléculaire de la Toxoplasmose" sur le site Internet du CNR Toxoplasmose continue à faire partie des objectifs du Pôle "Biologie Moléculaire" mais a pris du retard en raison de la complexité des analyses et études multicentriques dans ce domaine où quasiment rien n'est standardisé.

Le premier volet de recommandations, adressé aux professionnels de santé en général, et rédigé par le GdT en 2010, au sujet de la prise en charge de la toxoplasmose congénitale doit être travaillé par l'ensemble du CNR avant sa mise en ligne.

Un deuxième volet de recommandations s'adressera aux biologistes amenés à réaliser ce diagnostic moléculaire. La rédaction de ces recommandations prend plus de temps que prévu. Ceci pour plusieurs raisons : complexité et multiplicité des aspects à aborder, nécessité (pour certains points) d'une

validation par des études multicentriques, des expertises ou des conférences de consensus... La stratégie adoptée est de sub-diviser ces recommandations en un nombre maximum de points précis et de rédiger les différents items point par point.

Il est important de savoir que plus de 60 paramètres ont été identifiés par le LA comme intervenant dans la performance de la PCR en temps réel, et ce indépendamment de la méthode d'extraction qui rajoute au moins une inconnue supplémentaire. Il est impossible d'évaluer, de comparer et de fournir des recommandations sur l'ensemble de ces paramètres.

Toutefois, le Pôle "Biologie Moléculaire" veillera à établir des recommandations pratiques (ou règles de consensus) pour des contrôles de qualité intra-laboratoire, à destination de tous les laboratoires pratiquant le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose, en abordant en priorité le diagnostic prénatal.

Ces recommandations concerneront d'abord les pratiques pré-analytiques associées à ce diagnostic. La quantité d'items à analyser et la diversité des pratiques ont eu raison de l'objectif d'établir des pratiques reconnues comme fiables et adaptées par des études comparatives. En conséquence, des recommandations seront établies sur ces points sur la base du "bon sens" et de consensus au sein du GdT, accompagnées de niveaux de preuves échelonnés de A à E.

D'autres recommandations concerneront les pratiques analytiques :

- la nécessité et la réalisation d'une optimisation des conditions de PCR (température d'hybridation, [Taq], [MgCl²], [amorces], nombre de cycles...).
- le nombre minimum de réactions par échantillon.
- les témoins d'inhibition.
- l'interprétation des inhibitions de la PCR et la conduite à tenir dans de tels cas.
- la nature de la gamme de référence témoin pour la PCR en temps réel.
- la prévention des contaminations.
- l'intérêt d'une deuxième méthode de confirmation (et si oui, laquelle ?)

Enfin, sur la base des études réalisées au sein du GdT, des recommandations seront établies au sujet

- des méthodes d'extraction.
- *des pratiques de quantification en PCR en temps réel (nombre de points de gamme, échelle de la gamme, volume de l'échantillon de départ...)*

En définitive, à partir des données obtenues au sein du GdT, le LA s'efforcera d'établir des recommandations de méthodes "standard" pour un type d'équipement donné (l'équipement étant la seule variable totalement inamovible dans la méthode), méthodes décrivant l'ensemble des >60 paramètres impliqués. De plus, il sera proposé des seuils de détection minimum "standardisés" qui serviraient de référence aux différents laboratoires concernés. Ceci sera un pas important vers la standardisation au niveau national.

Par ailleurs, les études comparatives de trousse commerciales et de méthodes "maison" devraient permettre de dégager des trousse performantes qui seront recommandées en lieu et place de méthodes "maison".

Ces recommandations pourront être mises en ligne ou distribuées individuellement (en fonction de l'opinion du réseau). Elles devront évoluer en fonction des résultats des études comparatives, de l'expertise gagnée en réseau et des évolutions technologiques.

Le site Internet pourrait également (avec l'accord des participants) recenser la diversité des pratiques et méthodes de ce diagnostic moléculaire effectué au sein du CNR.

H-4.4 Collaborations à des expertises prévues auprès d'instances nationales

- Evaluation du programme national de dépistage sérologique systématique chez les femmes enceintes : Projet à définir en collaboration avec les autorités de santé et l'InVS. Un des aspects d'évaluation de ce programme repose sur la pérennisation du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales avec recueil annuel des cas et évaluation des tendances (stabilité ou non des indicateurs retenus et décrits dans le plan de surveillance, Annexe 3 et 4). L'HAS, dans son rapport du mois d'octobre 2009 a clairement indiqué cet objectif de réévaluation avec un délai de cinq ans après sa publication, en considérant les résultats du PHRC national portant sur le traitement préventif de la transmission au fœtus de l'infection lors des séroconversions pergestationnelles et ceux issus du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales. Le CNR sera consulté et participera à cette réflexion qui devrait avoir lieu en 2014 si l'on se réfère au calendrier indiqué par l'HAS.

Si de nouvelles mesures étaient adoptées en France concernant la politique de prévention de la toxoplasmose congénitale, le CNR serait associé pour en évaluer les effets au travers notamment de la pérennisation du système de surveillance permettant de comparer les indicateurs définis (dont le nombre et la sévérité des infections congénitales) au cours du temps. L'ensemble serait mené en concertation avec les autorités de santé et l'InVS.

- Evaluation des pratiques thérapeutiques au travers des deux PHRC nationaux en cours : l'un (Toxogest) portant sur le traitement préventif de la transmission au fœtus de l'infection lors des séroconversions pergestationnelles, l'autre (Toscane) portant sur la durée du traitement postnatal chez les enfants atteints. Les résultats de ces PHRC seront analysés par les investigateurs et le CNR sera associé à cette analyse (I. Villena participant au comité de pilotage des deux PHRC).

H-4.5. Publications

L'effort sera poursuivi pour publier les résultats obtenus par la Laboratoire Coordonnateur et les différents Laboratoires Associés, ces publications (et communications) permettent de diffuser les connaissances à la communauté nationale et internationale.