

**Plan du rapport annuel  
d'activité**

**2017**

**Centre de national de référence  
de la Toxoplasmose**

**Année d'exercice  
2016**

# SOMMAIRE

<b>Résumé analytique</b>	4
<b>1- Missions et organisation du CNR</b>	8
<b>2- Activités d'expertise</b>	
2.1 Evolutions des techniques au cours de l'année 2016	8
2.1.1 Techniques développées ou en développement	8
2.1.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats	9
- Pôle Sérologie	9
- Pôle Biologie Moléculaire	11
2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	12
2.2 Activités d'expertise de l'année 2016 et évolutions quantitatives et qualitatives	13
2.2.1 Expertise apportée par le Pôle Souches	
1- Nombre de souches ou prélèvements réceptionnés	13
2- Nombre de souches testées pour leur sensibilité	14
3- Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué	14
2.2.2 Expertise apportée par le Pôle Sérologie	14
2.2.3 Expertise apportée par le Pôle Biologie Moléculaire	14
1- Evaluation du Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose	14
2- Participation à l'amélioration et la "standardisation" du diagnostic moléculaire	15
<b>3- Activités de surveillance</b>	
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	16
3.1.1 Réseau de partenaires	16
3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées	17
3.1.3 Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances	17
3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	20
3.3 Participation aux réseaux de surveillance	21
3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune)	21
3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens	23
3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	23

#### **4- Alerte**

4.1 Procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les évènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année	24
4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	24

#### **5- Activités d'information, de formation et de conseil**

5.1 Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires	25
5.2 Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)	32
5.3 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR	32
5.3.1 Rétro-information aux partenaires	32
5.3.2 Diffusion aux professionnels	33
5.4 Activités de conseil aux professionnels	34
5.5 Activités d'expertises	35

#### **6- Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR**

6.1 Activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	37
6.1.a : Pôle Epidémiologie	37
6.1.b : Pôle Souches	41
6.1.c : Pôle Sérologie	42
6.1.d : Pôle Biologie Moléculaire	43
6.2 Publications et communications	44
i) Publications nationales	44
ii) Publications internationales	44
iii) Communications nationales	47
iv) Communications internationales	47
v) Conférences sur invitations	50

#### **7- Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux**

7.1 Coopération avec les laboratoires de santé animale et d'hygiène alimentaire dont les <i>LNR</i>	51
7.2 Coopération avec les laboratoires de l'hygiène alimentaire et de l'environnement	52

#### **8- Programme d'activités pour les années suivantes**

8.1 Perspectives du Pôle Epidémiologie	53
8.2 Perspectives du Pôle Souches	54
8.3 Perspectives du Pôle Sérologie	55
8.4 Perspectives du Pôle Biologie Moléculaire	56

# Résumé analytique

Le Centre National de Référence de la Toxoplasmose a été nommé en janvier 2006, renouvelé en 2012 puis en 2017.

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** (35 laboratoires en 2016, 37 pour le prochain mandat) compétents pour le diagnostic de cette affection. **Un Laboratoire Coordonnateur** (Reims) est en charge du Pôle Epidémiologie, entouré de **3 Laboratoires Associés animant 3 Pôles d'activités** : Pôle Souches (Limoges), Pôle Sérologie (Strasbourg) et Pôle Biologie Moléculaire (Montpellier).

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. Une réunion annuelle permet aux Laboratoires Coordonnateur et Associés de présenter les résultats de l'année écoulée et de discuter des actions à mener pour l'année à venir ; **pour l'année 2016 la réunion s'est tenue le 13 octobre à Paris, 70 % des membres du réseau y ont participé.**

La structuration en réseau permet une richesse dans l'expertise de par 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 (il est certifié selon la norme NF S 96900 depuis 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 toxoplasmose est une zoonose transmissible à l'homme et aux animaux (à sang chaud), fréquente et transmise par un parasite protozoaire ubiquitaire *Toxoplasma gondii*. Généralement bénigne pour l'homme, cette maladie peut cependant être grave :

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 restent 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 expliquait la très forte incidence de la toxoplasmose au cours du SIDA avec aujourd'hui 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). Il ne faut pas oublier que la toxoplasmose est également la première cause d'uvéïte postérieure chez l'immunocompétent et aboutissant en cela à un risque élevé de perte de la vision (Pleyer, 2014).

La toxoplasmose est l'une des infections les plus prévalentes en France avec des valeurs de séroprévalence chez l'adulte comprises entre 20 et 55%, 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 estimée à 54,3% dans l'enquête nationale périnatale de 1995 (Ancelle, 1996) et à 43,8% en 2003 (Berger, 2005) a encore chuté ces dernières années, estimée en 2010 à 37,8%. Un travail a été mené par l'InVS à partir des données de surveillance des toxoplasmoses congénitales produites depuis 2007 (enquêtes Toxosurv), des données des ENP réalisées et de modélisation mathématique pour estimer la tendance de l'évolution de la prévalence globale de la toxoplasmose et de son incidence. **Les résultats prévoient une baisse continue de l'incidence et de prévalence de la toxoplasmose pour les années à venir** (prévalence estimée à 26,9% en 2020, incidence estimée à 1,6/1000 en 2020 ; Nogareda et al., 2014). Cette baisse d'incidence peut se répercuter sur la surveillance des femmes enceintes (nombre de plus en plus élevé) et sur le nombre de cas de toxoplasmoses congénitales (nombre en diminution). Une question sur le maintien en l'état du programme national de dépistage de la toxoplasmose congénitale pourrait être soulevée au vu de cette évolution et du coût économique engendré par ce programme. Un rapport a d'ailleurs été publié par l'HAS en 2009, recommandant de continuer ce programme mais avec une réévaluation de sa pertinence d'ici quelques années. En 2017, **une analyse médico-économique du schéma diagnostic sérologique actuel en fonction de la prévalence décroissante chez les femmes enceintes sera conduite par le Pôle Sérologie et le Pôle Épidémiologie, elle pourrait permettre de déterminer de la nature des techniques à mettre en œuvre pour une rationalisation éventuelle du programme de dépistage** (voir Partie Perspectives). Cependant, il faut faire attention à une éventuelle diminution de la surveillance des femmes enceintes, le faible nombre de cas de toxoplasmoses congénitales grave est potentiellement le fait de cette surveillance accrue menée en France. Cette pratique est d'ailleurs recommandée pour être appliquée aux USA par plusieurs experts américains. Plusieurs membres du CNR ont participé à une publication commune sur les pratiques dans les deux pays.

*Peyron F., Mc Leod R., Ajzenberg D., Contopoulos-Loannidis D., Kieffer F., Mandelbrot L., Sibley Ld., Pelloux H., Villena I., Wallon M., Montoya JG. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. PLoS Negl; Trop. Dis., 2017, 11(2):e0005222*

Par ailleurs, le nombre de malades immunodéprimés est en augmentation dans le cadre des greffes d'organes ou greffes hématopoïétiques, du fait de traitements immunosuppresseurs nouvellement prescrits. Cependant depuis les nouveaux protocoles de traitement des patients HIV positifs (anti-protéases), les malades ont généralement un meilleur statut immunitaire et les toxoplasmoses observées chez les patients atteints de sida sont en diminution. Il n'y a pas à l'heure actuelle d'estimation précise des cas de toxoplasmoses de réactivation ou acquises **chez les immunodéprimés**, un objectif du CNR pour l'année 2017 est de mettre en place **un relevé de ces cas** à l'aide du logiciel de surveillance des toxoplasmoses congénitales « Toxosurv » (voir Partie Perspectives).

**La sérologie de la toxoplasmose reste la pierre angulaire du diagnostic biologique de la toxoplasmose.** Elle permet le dépistage des femmes à risque de contracter une infection pendant leur grossesse, un diagnostic précoce de la primo-infection, de l'infection congénitale, de la toxoplasmose oculaire et contribue au diagnostic des toxoplasmoses opportunistes. Toutefois la prévalence de cette complication baisse grâce aux mesures de prophylaxie primaire (hygiéno-diététique et sérologiques) prises à l'échelle nationale, mais la toxoplasmose reste une infection fréquente puisque près de 40% de la population française est atteinte. La toxoplasmose congénitale reste stable mais les enfants souffrant de cette affection présente des séquelles oculaires graves dans 17% des cas. Le

développement de nouveaux outils de diagnostic de la toxoplasmose oculaire, dont le diagnostic est essentiellement sérologique, a pu mettre en évidence une incidence de la TO chez 2%, en France, des patients immunocompétents infectés en dehors de toute toxoplasmose congénitale. On peut ainsi estimer à 1.000.000 le nombre de patients avec une TO active ou cicatricielle en France. En 2017, le Pôle Sérologie envisage d'ouvrir **un registre des toxoplasmoses oculaires** en collaboration avec le Pôle Épidémiologie, même en l'absence d'isolement de souches ou d'ADN.

Ainsi, actuellement la prévention et le diagnostic de la toxoplasmose sous toutes ses formes cliniques aboutissent à la prescription de près de 2 millions de sérologies par an pour un coût annuel estimé s'élevant à 32 millions d'euros. **L'évaluation des coffrets diagnostiques et des recommandations sur la réalisation et l'interprétation des sérologies est un enjeu majeur du Pôle Sérologie. En 2016, des questionnaires d'autoformation** ont été mis en place associés à la campagne de l'ANSM avec obligation de réponse pour valider les EEQ adressés par cet organisme.

**En 2016, l'HAS (Service évaluation des actes professionnels) a sollicité le CNR de la Toxoplasmose en vue de la rédaction d'un rapport** sur le Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire. **Le rapport a été publié par l'HAS en Février 2017, il a été mis sur le site internet du CNR avec l'accord de l'HAS. En 2017, un deuxième rapport** sur le Diagnostic biologique de la toxoplasmose chez les Immunodéprimés, sera également rédigé. Ces rapports sont destinés à aider l'ANSM à se prononcer sur la nomenclature des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la toxoplasmose.

En dehors de cet aspect économique, la nature de l'infection toxoplasmique se complique par la découverte de nombreuses souches de ce parasite, dont certaines sont extrêmement virulentes en zones tropicales dont la Guyane. Voyages, transport d'aliments contribuent à la dissémination de ces souches hautement pathogènes alors même qu'il n'y a pas de protection croisée entre elles. Un moyen d'inventorier cette diversité des souches responsables des toxoplasmoses pourrait venir du sérotypage que le CNR va essayer de développer en 2017.

Le diagnostic moléculaire a profondément amélioré le diagnostic de la toxoplasmose, autant de la toxoplasmose congénitale (TC) que chez l'immuno-déprimé, 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 est moins développé et non totalement 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 très spécifique, mais longue et lourde, réservée à quelques laboratoires spécialisés du CNR disposant d'une animalerie, elle a l'avantage d'isoler la souche responsable de l'infection pour permettre sa caractérisation. Cependant, l'inoculation souffre d'une moindre sensibilité comparée à la PCR pour le diagnostic. Le rôle des centres spécialisés (listés sur le site internet via la présentation des activités des laboratoires membres du réseau) pratiquant ces inoculations est à souligner et renforcer, le CNR recommande d'ailleurs que les laboratoires envoient les prélèvements positifs en PCR à ces centres pour tenter d'isoler les souches.

Le diagnostic moléculaire reste cependant paradoxalement, de l'ensemble des thématiques relatives à cette maladie, la facette la moins robuste et la plus sujette à questions. Il 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 majoritairement une méthode dite "maison" dont les performances varient en fonction des centres, et ce malgré l'arrivée récente de trousse commerciales adaptées. La diversification des équipes, alliée à la nature même des technologies nouvelles (y compris pour la PCR en temps réel) et aux impératifs des politiques d'achat des établissements de santé, 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). A cette diversité des méthodes s'est ajoutée une grande diversité des pratiques à la fois pré-analytiques et analytiques.

L'activité du Pôle Biologie Moléculaire en 2016 a continué à se concentrer principalement sur des missions d'expertise, en particulier **l'évaluation et l'amélioration des méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose**, avec pour objectif majeur la "standardisation" ou du moins l'"homogénéisation" du diagnostic moléculaire en France. Le Contrôle de Qualité national (CQ) en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose mis en place en 2002 se poursuit, avec des objectifs plus fins et des résultats extrêmement positifs : sensibilité globale de 94% en incluant les échantillons à moins de 10 toxoplasmes/mL, spécificité globale proche de 98%. La reproductibilité des résultats quantitatifs est moins fiable et fait l'objet d'un projet à moyen terme de ce Pôle. Les évaluations de méthodes commerciales se sont poursuivies et deux études rétrospectives portant sur les pratiques et les performances des méthodes moléculaires utilisées dans le réseau ont été menées. L'ensemble de ces études font l'objet d'articles qui seront soumis en 2017.

Les projets 2017 incluent de mettre au point des échantillons artificiels de sang et/ou placenta pour pouvoir tester les performances des méthodes sur ces matrices plus complexes. Des études concernant le "couple extraction-PCR" et la quantification seront reprises. La stabilité de la cible ADN *rep529* entre souches sera analysée à partir de données de NGS, ceci afin de valider cette cible pour la quantification. Enfin, une étude multicentrique sur la corrélation entre charge parasitaire et pronostic fœtal devrait pouvoir être achevée. Une étude sur l'intérêt de l'analyse du métagénome d'agents pathogènes pour le diagnostic de la toxoplasmose oculaire sera menée indépendamment par le Laboratoire de l'Hôpital Cochin (membre du réseau du CNR).

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). Cette surveillance portera sur 10 années en 2017 et un bilan global sera effectué en 2018 pour publication dans Eurosurveillance, les indicateurs choisis avec Santé Publique France permettent le suivi de l'évolution du nombre des cas, ces indicateurs (et leur évolution) seraient analysés si un changement intervenait dans la politique de dépistage de la toxoplasmose congénitale conduit en France.

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 ou à proposer (vaccination des chats ?), ainsi que de l'évaluation de l'efficacité du traitement (en particulier pour 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 sous sa forme oocyste et sous sa forme de kystes présents chez les animaux de rente ou sauvages est encore incomplète. Un renforcement des travaux dans ce domaine permettra de mieux considérer les facteurs de risque d'acquisition d'une toxoplasmose (contamination lié aux aliments ou à l'environnement) ou d'une toxoplasmose potentiellement sévère. Le Laboratoire Coordonnateur responsable du Pôle Épidémiologie travaille sur cette thématique, il collabore avec le Laboratoire National de Référence de l'ANSES (Maisons Alfort) pour contribuer à des études épidémiologique sur le réservoir animal. Il collabore aussi avec le Laboratoire Associé du Pôle Souches pour la caractérisation des isolats de l'environnement et de la faune animale.

**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 des précédentes mandatures, à ce renouvellement pour la période 2017-2021, 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.**

## **1 Missions et organisation du CNR**

*La description détaillée est présentée en Annexe 1.*

*En 2016 la structuration du CNR et les membres du réseau était la même qu'en 2015 avec 35 laboratoires participants, mais un changement d'organigramme est à signaler dans les laboratoires suivants :*

*Laboratoire Coordonnateur et Laboratoire Pôle Souches: le départ en juin 2016 d'un AHU responsable de l'évaluation de la chimiosensibilité de *T. gondii* (affecté au Pôle souches).*

*Laboratoire Pôle Sérologie: pas de changement.*

*Laboratoire Pôle Biologie moléculaire: le changement pour cause de mutation d'un membre du laboratoire support (Lille) affecté à Bordeaux et donc l'intégration de Bordeaux comme laboratoire support et arrêt pour Lille en 2016.*

*Il faut également noter l'intégration de deux laboratoires pour le futur renouvellement 2017-2021 (Lyon et Clermont-Ferrand). Ces laboratoires faisaient partie du réseau Toxosurv, ils ont demandé à intégrer le réseau des membres du CNR. Ainsi, le total des laboratoires participants au CNR de la Toxoplasmose s'élèvera à 37, en pratique ces laboratoires ont contribué aux missions du CNR dès 2016.*

*Le Laboratoire coordonnateur, le Laboratoire Pôle Souches et le Laboratoire Pôle sérologie et Biologie moléculaire ont demandé en 2016 des accréditations partielles COFRAC pour un certain nombre d'analyses visant le diagnostic de la toxoplasmose (domaine de la sérologie, la biologie moléculaire et l'inoculation à la souris). Ils ont été accrédités pour ces paramètres (voir Annexe 1).*

*Certains laboratoires membres du réseau sont également accrédités sur certaines analyses pour le diagnostic de la toxoplasmose. Un recensement des analyses accréditées sera effectué en 2017 par la Laboratoire Coordonnateur.*

## **2 Activités d'expertise**

*La description des techniques disponibles est à présenter en Annexe 2.*

### **2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2016**

#### **2.1.1 Techniques développées ou en développement**

*Technique de typage (Pôle Souches) :*

Les techniques de typage des souches ou ADN parasites par des techniques de biologie moléculaire reposent sur une PCR multiplex 15 marqueurs microsatellites (MS). Des techniques de PCR-RFLP (3 marqueurs) et de séquençage peuvent être rajoutées pour certaines souches atypiques.

La technique de PCR multiplex 15 MS a été validée par publication en 2010 (Ajzenberg et al. JCM, 2010). Elle a fait l'objet en 2012 d'une comparaison avec les résultats des techniques de PCR-RFLP (11 marqueurs) et de séquençage (4 introns) utilisées par d'autres équipes (Su et al., PNAS, 2012). Cette comparaison qui a porté sur 138 souches a montré le plus grand pouvoir discriminant des microsatellites, bien adapté aux études épidémiologiques. Elle a aussi permis un regroupement des génotypes dans des haplogroupes plus larges.

Le seuil de sensibilité de cette technique sur les ADN extraits de produits pathologiques a été évalué par PCR quantitative à un ct inférieur à 33 cycles.

*Technique d'évaluation de la chimio sensibilité aux anti-toxoplasmiques :*

- Après avoir mis au point le test de chimiosensibilité vis-à-vis de la sulfadiazine, nous avons mis au point le test de la chimiosensibilité à la pyriméthamine.

Pour rappel, le modèle de test de chimiosensibilité en 24 heures est adapté pour la pyriméthamine, mais n'est pas utilisable pour la sulfadiazine (variabilité des CI<sub>50</sub> trop



importante entre les différents essais par manque de reproductibilité de la méthode pour la sulfadiazine).

Après avoir mis au point les tests de chimiosensibilité en 72 heures et de 24 heures vis-à-vis de la sulfadiazine et de la pyriméthamine, nous avons souhaité développer les tests de chimiosensibilité en 48 heures.

Nous avons ainsi comparé la sensibilité à la sulfadiazine et à la pyriméthamine en 24, 48 et en 72 heures sur deux souches (RH et ME49).

Nos résultats montrent que le modèle en 48 heures est adapté pour la pyriméthamine, mais n'est pas utilisable pour la sulfadiazine.

En conclusion, le test de chimiosensibilité est possible en 24, 48 et 72 heures pour la pyriméthamine et n'est utilisable qu'en 72 heures pour la sulfadiazine, certainement dû au mode d'action des molécules testées. La  $CI_{50}$  des souches de *T. gondii* vis-à-vis de la pyriméthamine et/ou de la sulfadiazine sera donc déterminée à 72 heures.

#### - Evaluation de l'association pyriméthamine/ sulfadiazine à 72 heures

Cette technique d'évaluation utilise le même protocole que le test de chimiosensibilité décrit précédemment mais avec l'association pyriméthamine/sulfadiazine sur 72 heures. Dans un premier temps, des essais ont permis de déterminer la gamme de concentration pyriméthamine/sulfadiazine (2/120µg/mL point maximum) à utiliser pour tester des souches (absence de cytotoxicité sur les cellules Vero et encadrement de la  $CI_{50}$  sur des souches sensibles). Ce modèle reste à être validé sur un nombre de souches plus important.

### **2.1.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats**

#### Pôle Sérologie :

##### **a) Evaluation des réactifs de diagnostic sérologique**

L'expertise des réactifs de diagnostic sérologique pour la toxoplasmose a été poursuivie en 2016 avec l'évaluation d'un réactif d'immunoblot pour la détection de titres faibles d'IgG toxoplasmiques (LDBIO-Toxo II IgG) et d'un réactif d'immunochromatographie pour la détection rapide des IgG et des IgM (Toxoplasma ICT IgG-IgM, LDBIO) en comparaison avec la technique de référence le Dye Test (DT).

L'objectif de cette expertise est de comparer les performances de 2 tests qualitatifs destinés à détecter des titres faibles ou équivoques d'IgG sans IgM afin de déterminer si les protéines majeures du parasite sont reconnues par ces anticorps à taux limite. Il est important de déterminer la place de ces nouvelles méthodes dans le diagnostic sérologique de la toxoplasmose en tant que technique de deuxième intention et de confirmation car elles sont destinées à remplacer le test historique du Dye-Test. Par contre, les performances dans la détection des IgM spécifiques du réactif ICT IgG-IgM n'ont pas été évaluées.

Par ailleurs, 194 sérums provenant de 2 laboratoires hospitalo-universitaires experts au sein du réseau du CNR Toxoplasmose (CHU de Limoges et Marseille) et ont été sélectionnés par la technique de référence, le Dye Test. Parmi ces sérums, 90 sérums sont négatifs en IgG et IgM et 104 sérums positifs faibles en IgG (2-8 UI/mL) avec des IgM négatifs.

- Le réactif TOXOPLASMA ICT IgG-IgM (LDBIO diagnostics) est un test qualitatif rapide qui utilise la technique d'immunochromatographie pour la détection simultanée des IgG et des IgM toxoplasmiques spécifiques dans le sérum. Les performances du réactif annoncées par le fabricant indiquent une sensibilité du test de 100% associé à une spécificité de 97.7% (réaction croisée possible avec les sérums positifs pour le facteur rhumatoïde). Une double lecture a été réalisée et comme préconisé par le fabricant le résultat définitif retenu est celui obtenu après une lecture à 30 minutes.

- Le réactif LDBIO-TOXO II IgG (LDBIO Diagnostics) est un test qualitatif de détection des IgG spécifiques toxoplasmiques par immunoblot qui peut être utilisé sur le sérum, l'humeur aqueuse et le liquide céphalo rachidien (LCR). Les performances du réactif annoncées par le fabricant en comparaison avec la technique de Dye Test sont une sensibilité du test est de 99% avec une spécificité de 100%. L'interprétation des blots a été effectuée par les 8 membres du groupe de travail du pôle de sérologie du CNR toxoplasmose.

### Résultats

L'interprétation des blots Toxo II IgG est concordante pour les neufs membres du GT. L'analyse des résultats montre des concordances globales de 90.7 et 94.8% pour les réactifs ICT et WB IgG respectivement.

### IgG négatives

Parmi les 90 sérums négatifs en Dye test, 15 sont discordants dont 2 sont positifs en WBII IgG et 13 avec le réactif ICT. Les concordances avec le Dye Test pour les réactifs ICT et WB II IgG sont respectivement de 85.6 et 97.8%.

DT Négatif n=90		WB II Négatif	WB II Positif
		ICT Négatif	75
	ICT Positif	5	8

### IgG titres faibles ou équivoques

Parmi les 104 sérums positifs en Dye test, 5 sont discordants uniquement avec le réactif ICT avec un résultat négatif. Les concordances avec le Dye Test pour les réactifs ICT et WB IgG sont respectivement de 95.2 et 100%.

DT Positif n=104		WB II Négatif	WB II Positif
		ICT Négatif	0
	ICT Positif	0	99

### **b) Poursuite de la mise en place des Contrôles inter-laboratoires**

Les CIL mis en place ont été renouvelés en 2016 avec les réactifs

- IgA Platelia BioRad
- ISAGA IgA Biomérieux
- Toxoscreen Biomérieux
- LDBIO Toxo WB II IgG

Pour cette campagne, un envoi unique de 6 sérums a été adressé aux laboratoires participants. Les CIL ont été réalisés à 3 dates selon un planning déterminé avec 2 sérums par date. Des attestations de participation sont délivrées après la clôture de la campagne à chaque laboratoire participant.

### Résultats :

#### **- IgA Platelia BioRad (7 laboratoires participants)**

- 100% des interprétations sont conformes pour les sérums 1A et 2A
- 100% des interprétations sont conformes pour les sérums 3A et 4A
- 6 laboratoires sur 7 ont rendus une interprétation conforme pour les sérums 5A et 6A

Après la date de clôture du CIL, le laboratoire n°3 a re-testé le sérum 6A (même lot, nouveau coffret) : le résultat est de 1,09, positif. Le 6A correspondait au sérum d'une femme prélevée

au moment de son accouchement au mois de juillet: la séroconversion durant sa grossesse a été datée aux alentours du mois de janvier précédent. L'interprétation équivoque ou positive du taux d'IgA a été considéré comme acceptable dans ce contexte.

**- ISAGA IgA Biomérieux (6 laboratoires participants)**

- 100% des interprétations sont conformes pour les six sérums.

**- Toxoscreen Biomérieux (10 laboratoires participants)**

- 100% des interprétations sont conformes pour les six sérums.

**- LDBIO Toxo WB II IgG (18 laboratoires participants)**

sérum	1611	1612	1621	1622	1631	1632
Conforme	94,4%	100%	100%	100%	100%	100%

Pôle Biologie Moléculaire :

L'activité du Pôle "Biologie moléculaire" a continué à se concentrer principalement sur **l'évaluation et l'amélioration des méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose**, avec pour objectif majeur la "standardisation" du diagnostic moléculaire en France. L'activité de ce Pôle en 2016 a été freinée par divers obstacles conjoncturels, particulièrement la mise en place par les biologistes eux-mêmes de la démarche Qualité dans les laboratoires de Biologie médicale. Les différentes actions du Pôle Biologie Moléculaire sont listées ci-après :

**a) Evaluation de trousse commerciales de diagnostic**

Cet objectif est devenu primordial pour le Pôle au vu de l'apparition relativement rapide sur le marché de plusieurs kits de diagnostic PCR destinés à la toxoplasmose. Ceci constitue une nouvelle mission pour le Pôle. En effet, celui-ci se doit aujourd'hui d'établir une "veille" concernant ces nouveaux réactifs, très attractifs sur le plan de l'accréditation mais dont la valeur diagnostique n'a pas été suffisamment éprouvée.

Il est important de souligner ici l'importance de réaliser ces tests à une échelle multicentrique, impliquant au minimum 3 méthodes de PCR, en raison de la possible adéquation ou inadéquation entre les méthodes d'extraction d'ADN utilisées et le kit étudié (nos données non publiées).

A noter que le Pôle a privilégié les kits basés sur la cible d'ADN répétée "rep529", en raison de sa supériorité clairement établie, en particulier par les travaux réalisés au sein du Pôle, sur la cible plus classique dite "gène B1".

◆ L'évaluation des performances du coffret **EliTech® Toxo ELITE MGB**, commercialisé pour le diagnostic moléculaire sur liquide amniotique et sang, et débutée au L-S de Rennes, a été étendue à deux autres L-S (Grenoble et Paris-Cochin) en 2015 et 2016, afin d'analyser la sensibilité et la spécificité sur un plus grand nombre d'échantillons cliniques et avec plusieurs méthodes d'extraction. Les performances du kit sont bonnes pour les prélèvements paucicellulaires (LA, LCR, HA) ; pour les prélèvements riches en inhibiteurs (sang, placenta), il génère des faux négatifs pouvant être interprétés comme des interférences avec le "contrôle interne" pour les faibles concentrations ou une sensibilité accrue aux inhibiteurs. De façon surprenante, l'utilisation du kit d'extraction Elitech® (plutôt que du kit Qiagen®) altère les performances du kit d'amplification Elitech® pour les faibles concentrations, ce qui confirme d'autres données concernant l'importance du "couple extraction-PCR" dans la sensibilité globale de la technique.

L'étude a fait l'objet d'un poster au Congrès de la Société Française de Parasitologie à Grenoble en Mars 2016, et un article concernant cette étude a été soumis dans *J. Clin. Microbiol.*

◆ Une autre évaluation comparative d'une trousse diagnostique **basée sur la LAMP** et en développement chez **Diasorin®** a été finalisée au L-A de Montpellier en 2014-2015. Cette trousse s'est révélée excellente pour les liquides amniotiques lors d'essais comparatifs avec la méthode de référence du L-A de Montpellier; elle est clairement moins performante sur les échantillons de sang ou placenta. Un article a été soumis dans *J. Clin. Microbiol.*

◆ Une évaluation du kit **TibMolBiol (Roche®)** a été réalisée (coordonnateur = L-S de Montpellier + 3 L-S participants à Grenoble, Rennes, Bordeaux). Les performances du kit sont comparables à celles des méthodes PCR de référence pour ce diagnostic moléculaire dans des échantillons biologiques variés (LA, LCR, LBA, humeur aqueuse ou liquide d'adénopathie, placenta, sang). Néanmoins, il peut conduire à des faux négatifs sur des échantillons comportant une faible ou très faible charge parasitaire lorsqu'une seule réaction par échantillon est réalisée. La présence d'un contrôle interne ne provoquant pas d'inhibition sur la détection des faibles concentrations est intéressante.

Cette étude a fait l'objet d'une communication (poster) au congrès de la Société Française de Parasitologie (Toulouse, 29-30 mars 2017).

**b) L'étude comparative évaluant les performances de cinq méthodes d'extraction automatisées de l'ADN de Toxoplasme** (en termes de sensibilité et de reproductibilité) à partir du liquide amniotique (coordonnateur = L-S de Dijon + 3 L-S participants (Grenoble, Paris-Cochin, Paris-Pitié-Salpêtrière) a été finalisée. Cette étude prospective multicentrique était organisée dans le cadre de l'activité de standardisation des outils du diagnostic de toxoplasmose au sein du Centre National de Référence de la toxoplasmose.

L'étude a porté sur une méthode manuelle dite de référence (QiaAmp DNA Mini kit, Qiagen®) et cinq méthodes automatisées : MagNapure compact, Roche® ; Biorobot EZ1, Qiagen® ; EasyMag, BioMérieux® ; Macherey/Nagel® (adapté à un automate ouvert type TECAN) et 8LX, Bionobis®. L'analyse comparée des sensibilités des différentes méthodes a mis en évidence que deux méthodes étaient significativement moins sensibles pour extraire l'ADN de toxoplasme dans des échantillons de LA. Deux autres méthodes étaient aussi voire plus sensibles que la méthode manuelle et donc offraient de bonnes performances pour cette extraction.

D'autres observations suggèrent qu'outre la quantité, la qualité de l'ADN extrait joue un rôle important dans les performances des techniques de PCR utilisées. Au total, deux méthodes sur les cinq évaluées apparaissent comme les plus performantes pour l'extraction d'ADN tout en respectant mieux la qualité des ADN extraits.

Outre leur publication dans une revue internationale, ces résultats aideront à établir des recommandations destinées aux différents laboratoires de diagnostic anténatal. L'article correspondant est en attente de l'accord des responsables de Diasorin®.

### **2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires**

Les techniques de typage par PCR multiplex avec 15 microsatellites restent du domaine de l'expertise et ne sont pas transférées.

Les tests de chimiosensibilité sont effectués sur demande par le Laboratoire Coordonnateur, ces tests restent du domaine de l'expertise vu la lourdeur des techniques.

Les résultats des évaluations des coffrets et réactifs diagnostiques pour la sérologie permettent aux différents laboratoires de juger de la pertinence d'emploi de tel ou tel coffret selon les circonstances cliniques.

Pour la biologie moléculaire, les techniques restent encore souvent des techniques « maison », leur évaluation par chaque laboratoire est faite au moyen des résultats du contrôle national de qualité qui permet à chacun des participants de se situer par rapport aux contrôles (en sensibilité de la méthode PCR et en quantification lorsqu'elle est pratiquée par le laboratoire).

## 2.2 Activités d'expertise de l'année 2016 et évolutions quantitatives et qualitatives :

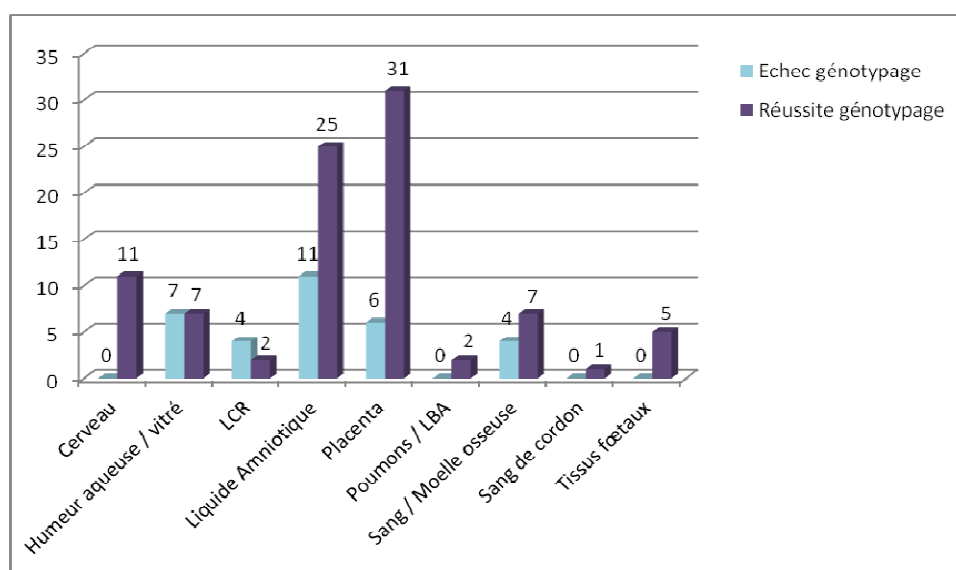
### 2.2.1 Expertise apportée par le Pôle Souches

1- Nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...) ;

**Tableau 1 :** Prélèvements reçus au CNR Toxoplasmose en 2016 et succès du génotypage :

Nature des prélèvements 2016	Génotypage ADN		Total ADN	Génotypage Souche		Total Souche	Total général
	Echec	Succès		Echec	Succès		
Cerveau		11	<b>11</b>			<b>0</b>	<b>11</b>
Humeur aqueuse / vitré	7	7	<b>14</b>			<b>0</b>	<b>14</b>
LCR	3	2	<b>5</b>	1		<b>1</b>	<b>6</b>
Liquide Amniotique	9	14	<b>23</b>	2	11	<b>13</b>	<b>36</b>
Placenta	3	3	<b>6</b>	3	28	<b>31</b>	<b>37</b>
Poumons / LBA		1	<b>1</b>		1	<b>1</b>	<b>2</b>
Sang / Moelle osseuse	4	7	<b>11</b>			<b>0</b>	<b>11</b>
Sang de cordon			<b>0</b>		1	<b>1</b>	<b>1</b>
Tissus fœtaux		5	<b>5</b>			<b>0</b>	<b>5</b>
<b>Total général</b>	<b>26</b>	<b>50</b>	<b>76</b>	<b>6</b>	<b>41</b>	<b>47</b>	<b>123</b>

- Les 123 prélèvements reçus en 2016 ont fait l'objet d'un génotypage. Sur ces 123 prélèvements, le génotypage a été réussi dans 74% des cas (91/123), soit 65,8% (50/76) pour les extraits d'ADN provenant de produits pathologiques et 87,2% (41/47) pour les souches isolées sur souris. Les six échecs de génotypage pour les souches correspondent à des cerveaux de souris pour lesquels l'observation microscopique n'a pas permis de retrouver de kystes toxoplasmiques ou n'en a retrouvé qu'une très faible quantité. Pour les extraits ADN, la médiane des échecs en 2016 correspond à un Ct trouvé dans les centres correspondants à 32 (Ecart-type : 4,6), les échecs de génotypage correspondant en général à des produits pathologiques très pauvres en ADN toxoplasmique (en particulier les prélèvements d'humeur aqueuse et de LCR).



**Figure 1 :** Taux de réussite du génotypage en fonction de l'origine du prélèvement (extraits ADN de produits pathologiques et souches obtenues à partir de ces produits pathologiques confondus) (données 2016)

## 2- Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats :

En 2016, aucune souche n'a été adressée au CNR pour évaluation de la chimiosensibilité aux deux anti-toxoplasmiques utilisés dans le traitement des toxoplasmoses. Le laboratoire de Reims a testé un outil de criblage de composés à potentiel antiparasitaire sur *Toxoplasma gondii* (voir Paragraphe 3).

## 3- Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué.

En 2016, 9 souches incluses au Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma* ont été distribuées pour des activités de recherche (4 projets de recherche).

### **2.2.2 - Expertise apportée par le Pôle Sérologie**

voir paragraphe précédent (expertises des réactifs et mise en place des CIL, voir 2.1.2 Pôle Sérologie)

### **2.2.3 - Expertise apportée par le Biologie Moléculaire**

#### 1) Evaluation du Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose :

Le Pôle Biologie moléculaire du CNR a continué à organiser au niveau national le Contrôle de Qualité externe (CQE) en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose mis en place en 2002. Ce CQE concerne toujours exclusivement le DPN, excluant pour l'instant le travail sur le sang et le placenta. Il contient des échantillons de liquide amniotique (LA) négatifs et positifs consistant en une gamme de concentrations relativement basses de toxoplasmes, préparées à partir du matériel étalon lyophilisé préparé par le Pôle Biologie moléculaire du CNR. Les concentrations les plus basses entre 5 et 10 T/mL sont adressés en multiplicata afin d'éliminer les effets de la Loi de Poisson. Ces concentrations qui peuvent paraître basses, sont importantes en clinique : dans l'étude de Costa et al. (*Prenat Diagn.* 2001), la moitié des LA infectés avaient une charge parasitaire < 10 Toxoplasmes/mL; et dans notre étude rapportée plus bas, la médiane des concentrations observées dans le LA de femmes enceintes infectées est de 7 Toxoplasmes/mL. Ces valeurs justifient donc pleinement de réaliser une surveillance de la sensibilité de la PCR -*Toxoplasma* pour des concentrations basses (<10 Toxoplasmes/mL).

En 2016, 29 centres participants étaient inscrits. Le Pôle Biologie moléculaire a organisé deux sessions de CQ.

Le **premier envoi** de Mars 2016 consistait en trois échantillons lyophilisés de liquide amniotique, l'un négatif et les deux autres artificiellement contaminés par des toxoplasmes (TgH25036, souche de type III extraite d'un placenta) à une concentration de  $38 \pm 10$  T/mL. Cet envoi en duplicata nous a permis d'analyser la reproductibilité des résultats exprimés en Cp, par le calcul du  $\Delta Cp$  et en concentration en T/mL.

Concernant la reproductibilité des résultats exprimés en Cp entre les deux échantillons ( $\Delta Cp$ ), 19/29 laboratoires obtiennent un  $\Delta Cp$  compris entre -1 et +1. Concernant la reproductibilité des résultats exprimés en T/mL, neuf laboratoires ont rendu au moins une des valeurs dans l'intervalle  $\times 2$  [19-76 T/mL] et trois laboratoires ont rendu les deux échantillons dans cet intervalle.

La **session de Septembre** 2016 consistait en l'envoi de onze échantillons lyophilisés de liquide amniotique (LA) et de plasma (PI), soit négatifs, soit artificiellement contaminés par des toxoplasmes (même souche) à des concentrations allant de  $4 \pm 4$  à  $80 \pm 40$  T/mL. Cet envoi visait à tester (i) une large gamme de concentrations ; (ii) des concentrations très basses, envoyées en triplicata et pour lesquelles des résultats "inconstamment positifs" (IP) étaient attendus, (iii) une matrice synthétique de LA (LAs) et (iv) la détection de faux positifs. Un laboratoire a rendu deux résultats faux positifs, soulignant la nécessité de surveillance d'éventuelles contaminations et le soin qui doit être apporté à la prévention de celles-ci. Pour les concentrations les plus basses, quatre laboratoires ont rendu des résultats faux négatifs et quatre autres ont rendu des résultats inconstamment positifs (IP). Un résultat IP pose question sur son interprétation dans la pratique clinique, et une réflexion est engagée à ce sujet au sein du Pôle "Biologie moléculaire". La reproductibilité des résultats exprimés en

écart maximal de Cp ainsi que l'exactitude des résultats quantitatifs exprimés en T/mL en fonction de la matrice ont également été analysées et ont montré de grandes disparités entre les laboratoires. Le CNR maintient donc son conseil de ne pas rendre de quantification absolue aux cliniciens.

Par ailleurs, le Pôle Biologie moléculaire du CNR a continué **son rôle d'expert scientifique** auprès de la compagnie Quality Control for Molecular Diagnosis (QCMD®, Glasgow, UK) qui distribue son CQE à une centaine de laboratoires européens. En contrepartie, QCMD® offre gracieusement un nombre suffisant d'échantillons au CNR pour pouvoir organiser le CQE national.

## 2) Participation à l'amélioration et la "standardisation" du diagnostic moléculaire :

### **Expertise d'échantillons faussement négatifs**

Afin de déterminer si des **faux négatifs en DPN** pouvaient être dus à un manque de sensibilité technique de certaines méthodes "maison" (plutôt qu'à une charge parasitaire indétectable), le CNR a organisé annuellement depuis 2011 une action proposant aux centres qui avaient enregistré de tels faux négatifs (en présence d'une toxoplasmose congénitale avérée) de faire expertiser l'échantillon de liquide amniotique correspondant au L-A de Montpellier. En 2016, 8 échantillons négatifs ont été adressés au L-A de Montpellier, et tous ont été confirmés. Au total, depuis 2011, une vingtaine de centres ont déclaré 47 faux négatifs et sept analyses ont pu être reclassées en "vrai positif" en diagnostic moléculaire. Ceci a démontré que, malgré une excellente sensibilité globale dans le réseau, une sensibilité insuffisante persistait pour certains centres.

Cette action sera poursuivie. Elle devra s'accompagner sans doute d'une démarche plus active de la part du L-A pour prodiguer des conseils aux centres volontaires afin d'améliorer la sensibilité de leur méthode de PCR. Elle participe à l'amélioration et l'homogénéisation globale des performances de ce diagnostic au niveau national.

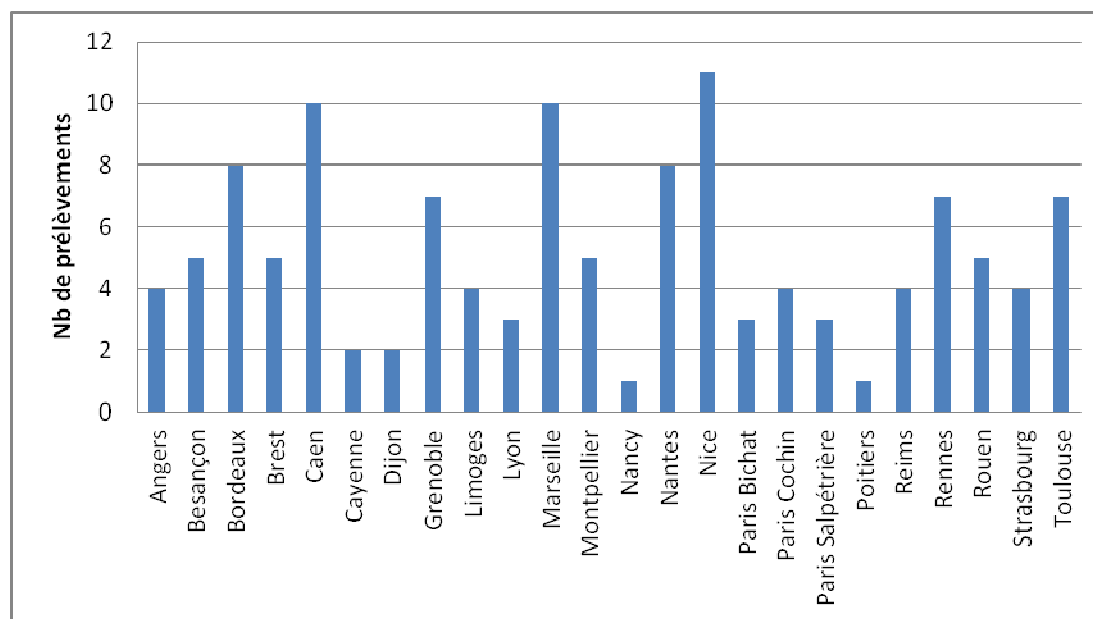
### **3 Activités de surveillance**

#### **3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections**

##### **3.1.1 Réseau de partenaires :**

###### **(i) description des partenaires, répartition géographique**

Sur les 33 laboratoires de Parasitologie des CHU et de quelques centres hospitaliers non universitaires de métropole et des DOM-TOM, 24 ont adressé en 2016 des prélèvements pour génotypage, accompagnés de données cliniques et épidémiologiques.



**Figure 2 :** Participation des partenaires du réseau à l'envoi de prélèvements au CNR Toxoplasmose en 2016

###### **(ii) estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau**

Ces centres assurent une bonne représentativité du territoire métropolitain et des départements et territoires français d'outre-mer (Guyane, Nouvelle Calédonie, Polynésie Française). La réelle représentativité géographique des prélèvements peut être estimée d'après le département d'habitation des patients. En 2016, l'Auvergne, la région Centre et le Nord sont sous représentées alors que l'Aquitaine a fortement progressé dans ses envois. Il faut rappeler cependant que, dans le domaine de la toxoplasmose, le lieu d'habitation ne reflète que partiellement l'origine géographique de la souche (nourriture importée, réactivation d'infection ancienne acquise dans un autre lieu ...). Les territoires et départements d'Outre-Mer sont représentés grâce soit à la participation directe de laboratoires de ces départements, soit à l'envoi de leurs prélèvements pour diagnostic dans des centres référents de métropole.

L'analyse des souches de cas de toxoplasmose humaine provenant d'autres pays étrangers permet de mieux connaître l'épidémiologie du toxoplasme et par là même d'identifier d'éventuelles importations de souches sur le territoire français. En 2016, le CNR a été sollicité par des laboratoires de référence européens (Belgique, Pays-Bas et Danemark) et a effectué un génotypage pour un laboratoire tunisien (voir paragraphe 3.4).



### Département d'habitation des patients



© IGN, GeoFLA®, 2016 - France entière par département

**Figure 3 :** Département d'habitation des patients dont les prélèvements ont été adressés au CNR Toxoplasmose pôle souches en 2016 (n= 103) [5 NC et 2 TOM]

#### 3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées

Les souches sont isolées à partir des prélèvements biologiques des patients atteints soit de toxoplasmose acquise (chez des immunocompétents ou des immunodéprimés), soit de toxoplasmoses de réactivations (chez des immunodéprimés) soit de toxoplasmoses congénitales (chez des femmes enceintes ou des nouveau-nés/enfants infectés).

#### 3.1.3 Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances

Les 123 prélèvements adressés au CNR en 2016 correspondent à 110 patients.

Les formes cliniques d'origine des 110 patients dont les prélèvements ont été adressés au CNR en 2016 sont les suivantes :

- 68 (61,8 %) cas de toxoplasmose congénitale (stable par rapport à 2015).
- 15 (13,6 %) cas de toxoplasmose oculaire de patients immunodéprimés ou immunocompétents (+ 4,4% par rapport à 2015).
- 26 (23,6 %) cas de toxoplasmose systémique de patients immuno-déprimés (- 2,2 % par rapport à 2015).
- 1 (0,9 %) cas de toxoplasmose systémique d'un patient immuno-compétent (versus 3 cas en 2015).

Le génotypage a été possible pour 82/110 patients (74,5 %) [22 NA + 6 ND](Figure 4).

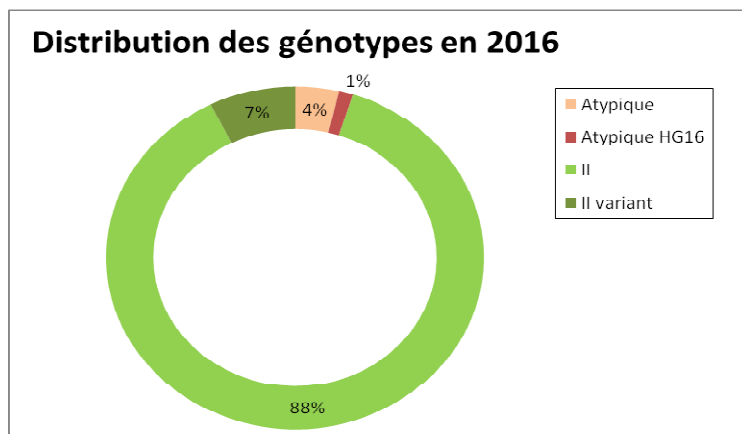


Figure 4 : Répartition des différents génotypes observés en 2016 pour 82 patients.

Tableau 2 : Répartition des génotypes par forme clinique chez les 82 patients (2016)

Génotype	T. congénitale	T. immuno-déprimés	T. oculaire	Nb de patients
Atypique	1	2	0	3
Atypique HG16	1	0	0	1
II	48	17	7	72
II variant	4	2	0	6
Total	54	21	7	82

Tableau 3 : Répartition des génotypes par origine géographique supposée de la contamination (2016)

Génotype	Afrique	Amérique du Sud	France	France ou Algérie	Grande Bretagne	NC	Océan Indien	Polynésie Française	Total général
Atypique		1					1	1	3
Atypique HG16			1						1
II			70	1		1			72
II variant			5			1			6
NA		2	16		1	3			22
ND	2	1	3						6
<b>Total général</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>95</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>110</b>

En 2016, les données remarquables du génotypage sont les suivantes :

- le type II et ses variants sont observés chez 95,1% des 82 patients pour lesquels le génotypage a été possible (vs 79% en 2015, 83,5% en 2014, 87% en 2013). Il est responsable de 96,3% (52/54 isolats génotypés) des cas de toxoplasmoses congénitales avec les mêmes caractéristiques que d'habitude, 100% (7/7 isolats génotypés) des cas de toxoplasmoses oculaires (immunodéprimés ou immunocompétents), de 90,5% (19/21 isolats génotypés) des cas de toxoplasmoses systémiques des patients immunodéprimés. Pour ces derniers, il s'agit de patients d'hématologie dans 9 cas (allogreffe de moelle ou hémopathies), de patients sidéens (9 cas) et d'un cas de toxoplasmosse pulmonaire survenu chez un patient atteint de cancer broncho-pulmonaire.

- pour la première fois depuis la création du CNR, aucun type III n'a été identifié en 2016. Rappelons que ce génotype représente globalement 4% des isolats jusque-là adressés au CNR, provenant de patients infectés en France ou plus souvent hors de France. La plus faible proportion de patients infectés hors de France en 2016 peut expliquer l'absence de type III en 2016.

- les génotypes différents du type II observés en 2016 sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 4 : Génotypes différents du type II observés en 2016 (LCR : liquide céphalo-rachidien, ID : immunodéprimé, TC : toxoplasmose congénitale, SC : séroconversion, SA : semaines d'aménorrhée, SAM : syndrome d'activation macrophagique).**

Code CNR	Nature du Prélèvement	Origine supposée de la contamination	Clinique	Génotype MS	Remarque
TgH 13192A	Liquide amniotique	Polynésie Française (98)	TC après SC à 13 SA, mort fœtale IMG 22 SA / dilatation ventriculaire bilatérale, agénésie septale	Atypique	Proche d'une souche brésilienne-TgCkBr130 Différente du type « <i>Polynesian</i> »
TgH 26158A	Placenta	France (44)	TC après SC 7SA, mort fœtale 18 SA / microcéphalie	Atypique HG16	
TgH 32158A	Cerveau	Océan Indien (Ile Maurice)	ID / HIV / T cérébrale, pneumocystose associée / réactivation / amélioration complète	Atypique	Proche de TgH 38021A, patiente infectée à la Réunion
TgH 13191A	LCR	Amérique du Sud (Colombie)	ID / HIV / T disséminée (PCR positive dans cerveau et moelle osseuse) et oculaire (décollement rétinien unilatéral), SAM, Histoplasmosse associée / CD 12 / réactivation / amélioration complète	Atypique	

- Les **2 cas de toxoplasmoses congénitales dues à des génotypes différents du type II** ont été des cas sévères conduisant à une mort fœtale avec des anomalies cérébrales. Mais la responsabilité du génotype est difficile à incriminer car dans les 2 cas, il s'agissait de séroconversions précoces en cours de grossesse (7 et 13 SA).

- La souche de *Polynésie Française* est différente des 4 autres souches de Polynésie Française analysées au CNR, plus proche d'une souche brésilienne que du type *Polynesian* observé pour les 4 autres cas (formes asymptomatiques après séroconversion maternelle allant de 18 à 30 semaines selon les cas).

- La souche acquise en France dans la région nantaise appartient à l'haplogroupe 16. Cet haplogroupe constitue un groupe génétique très homogène déjà retrouvé dans 5 autres cas depuis le début du CNR dont 4 toxoplasmoses congénitales (1 mort fœtale et 3 enfants vivants avec des rétinocchoroïdites sévères) et 1 toxoplasmose oculaire (panuvéite bilatérale) chez un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde et traité par méthotrexate. Ces quelques cas font suspecter un tropisme oculaire pour ce génotype. Ici, le fœtus a développé une microcéphalie, forme classique d'atteinte cérébrale, mais plus rarement observée que la dilatation ventriculaire. Comme chez 4 autres patients infectés par l'haplogroupe 16, il n'a pas été retrouvé pour la patiente de 2016 d'éléments permettant de suspecter une source d'infection hors du territoire métropolitain (pas de notion de voyage, ni de consommation d'aliments importés)

- Les **2 cas de toxoplasmoses de patients immunodéprimés dues à des génotypes différents du type II** sont survenus chez des patients sidéens fortement immunodéprimés, avec d'autres infections opportunistes associées. S'agissant de patients originaires de Colombie dans un cas et de l'Ile Maurice dans l'autre cas, la réactivation observée au cours de l'infection HIV est fort probablement celle de souches circulant dans ces pays. La souche du patient originaire de l'Ile Maurice est d'ailleurs proche d'une autre souche analysée au CNR et originaire de l'Ile de la Réunion, faisant évoquer un groupe génétique propre à l'Océan Indien qui devra être confirmé.

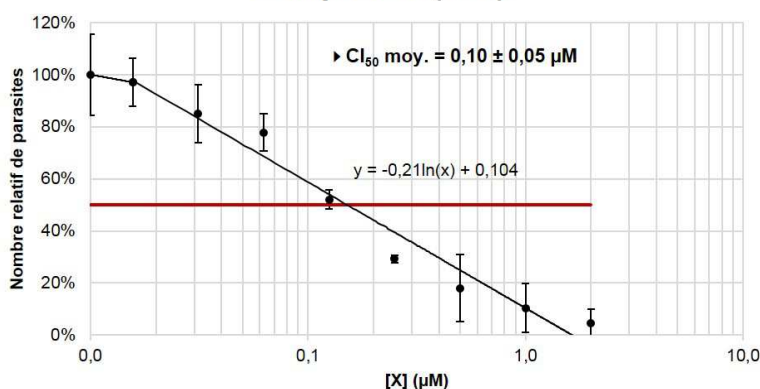
### 3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

#### Mise au point d'un outil de criblage de composés à potentiel antiparasitaire : application à la Pathogen Box

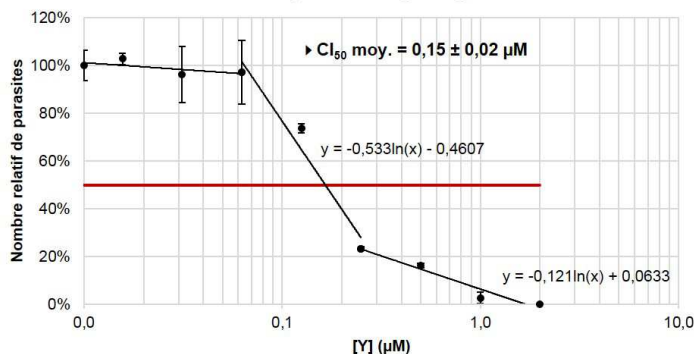
Un panel de 400 composés chimiques de synthèse, fournis par la fondation *Medecines for Malaria Venture (MMV)* sous le nom de « Pathogen Box », a été criblé sur *T. gondii* (souche RH). Dans ce travail, une méthode de criblage moléculaire a été développée afin de déterminer l'efficacité de composés potentiellement antiparasitaires vis-à-vis de *T. gondii*. La méthodologie utilise le test de chimiosensibilité précédemment décrit mais une seule concentration est testée (1 $\mu$ M) avec chaque molécule. Si le composé présente un pourcentage d'inhibition de la multiplication parasitaire supérieur à 50, le composé est considéré comme actif.

Sur ces 400 composés criblés, 14 se sont montrés efficaces contre *T. gondii*. Après avoir évalué la Concentration Cytotoxique à 50% (CC<sub>50</sub>), la Concentration Inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>) a été déterminée. Il en résulte que 8 des 14 composés sont sélectivement actifs contre *T. gondii*, dont trois particulièrement efficaces (exemples de deux composés actifs ci-dessous).

**Evolution du nombre relatif de parasites (RH) en fonction de la concentration en composé X (72h)**



**Evolution du nombre relatif de parasites (RH) en fonction de la concentration en composé Y (72h)**



Cette technique permet donc un criblage rapide d'un grand nombre de composés et serait applicable sur d'autres parasites. A terme, il pourrait permettre l'identification de nouvelles molécules antiparasitaires, étoffant ainsi l'arsenal thérapeutique actuel.

### **3.3 Participation aux réseaux de surveillance**

#### **3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune)**

Le laboratoire coordonnateur du CNR de la Toxoplasmose a mis en place avec l'InVS puis Santé Publique France, un réseau de surveillance des toxoplasmoses congénitales en France en 2006 (Dr V Goulet, InVS). Depuis octobre 2012 c'est le Dr Tourdjman qui est l'interlocuteur du CNR.

Une réunion annuelle a lieu à Santé publique France en présence des membres impliqués dans le pilotage de la surveillance des toxoplasmoses congénitales (comité Toxosurv), elle a eu lieu le 01 février 2017 (*ordre du jour Annexe 3*). Cette réunion permet de faire le bilan des actions menées par le CNR lors de l'année écoulée (2016) sur le plan de la toxoplasmose (essentiellement toxoplasmose congénitale) et d'établir les priorités d'étude si besoin.

#### **Mise en place d'un système de surveillance des toxoplasmoses congénitales en France.**

*Rappel : 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 toxoplasmose 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 national de la toxoplasmose congénitale basé sur une notification des cas de toxoplasmoses congénitales diagnostiqués sur le territoire national. Un groupe de travail spécifique a été constitué par l'InVS comprenant actuellement : des membres du Pôle Epidémiologie du CNR, des épidémiologistes de l'InVS, un pédiatre (P. Garcia, Marseille), et un médecin épidémiologiste en Santé Publique (C. Binquet, Dijon). Ce groupe revoit chaque année les objectifs du système national de surveillance.*

Le système de surveillance repose sur la notification des cas de toxoplasmose congénitale via un logiciel de déclaration développé en partenariat avec la Société Epiconcept. Le laboratoire Coordonnateur du CNR en collaboration étroite avec l'InVS a organisé 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, constitué par les laboratoires spécialisés dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (n= 35) et des laboratoires polyvalents (n=14) dont la fréquence de notification est moindre (Annexe 4).

Les objectifs de ce système de surveillance sont les suivants :

Constituer une base nationale des cas de toxoplasmose congénitale afin d'estimer la prévalence de la toxoplasmose 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 toxoplasmose 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).  
A sa création, 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.

#### **Résultat du système de surveillance pour l'année 2015 : (Annexe 4)**

Le Laboratoire Coordonnateur fournit tous les ans à l'InVS/ Santé Publique France un rapport synthétique sur les cas notifiés au cours de l'année N-1, ainsi en 2016 les données d'activités de surveillance des toxoplasmoses congénitales pour l'année 2015 ont été transmises. **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 (13/10/2016) et transmis à Santé Publique France.** Une réunion du comité de pilotage « Toxosurv » est

organisée annuellement 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. **Cette réunion a eu lieu le 01/02/2017 et a permis de valider le rapport présenté.** Une extraction du rapport (avec données minimales choisies avec Santé Publique France) est ensuite mise sur le site Internet du CNR. (<http://www.chu-reims.fr/CNR> toxoplasrose).

En 2015, **246 cas de toxoplasmoses congénitales** ont été diagnostiqués en France conduisant à une interruption de grossesse dans 5 cas (4 Interruptions de grossesse pour raison médicale et 1 Mort fœtale in utero) ; 231 enfants sont nés dont 5 présentent une atteinte sévère de la maladie et 15 une atteinte modérée, 211 enfants sont asymptomatiques à la naissance. Un logigramme représente le récapitulatif de ces cas (Annexe 4). Ainsi, la prévalence globale de la toxoplasme congénitale observée en France est de **3,1 pour 10 000 naissances** et la prévalence des cas de toxoplasme congénitale diagnostiqués à la naissance est de 2 pour 10 000 naissances. La létalité liée à la toxoplasme congénitale est de 2 % (stabilité depuis 2007) et la morbidité globale représente 8% (taux assez stable au cours du temps, entre 8 et 10% depuis 2007). (Voir tableau des indicateurs remarquables, Annexe 4).

- Le taux de toxoplasmoses graves à la naissance est de 2% des cas de TC (identique aux années précédentes) et celui des chorioretinites de 3% des cas de TC (assez stable aux années précédentes).

- Le nombre de cas de TC diagnostiqués au-delà de l'âge de 2 mois est stable depuis le début de la surveillance (23 cas en 2015, représentant 14,5% des diagnostics de TC chez les enfants), il témoigne le plus souvent d'une interruption dans le suivi des enfants nés de mère ayant contracté une toxoplasme pendant la grossesse. Ces cas de diagnostic tardifs sont investigués chaque année par le Laboratoire coordonnateur auprès des centres notifiant afin d'évaluer la raison de ce délai, dans la majorité des cas cela n'est pas lié à un problème de techniques de diagnostic. **Aussi, le CNR recommande un suivi sérologique mensuel de ces enfants afin d'établir le diagnostic précocement et instaurer le traitement spécifique le plus rapidement pour diminuer le risque de séquelles ultérieures.**

Ces données de surveillance montrent un nombre de cas de TC par an évoluant entre 179 cas (année 2013) et 272 (année 2007, instauration de la surveillance).

Nous pouvons noter d'une part que l'IPP a fermé en 2010 et que certains diagnostics reportés dans d'autres laboratoires n'ont peut-être pas été déclarés de façon exhaustive ; d'autre part, le laboratoire Cerba n'a pas notifié les cas diagnostiqués en période anténatale depuis 2010, engendrant une perte de déclaration et un nombre total de cas de TC légèrement sous-estimé. En 2017, les cas seront déclarés par Cerba (même interlocutrice pour les diagnostics anténatals et postnatals).

La prévalence globale de la toxoplasme congénitale est actuellement inférieure à celle estimée à partir d'enquêtes anciennes et l'incidence de la toxoplasme estimée par Santé Publique France (Nogarada et al., 2014) apparaît aussi en forte diminution, pouvant expliquer cette diminution du nombre de cas de toxoplasme congénitale.

L'importance du recueil annuel des cas est donc réelle afin d'estimer de façon objective l'incidence de la toxoplasme en France. Le faible nombre de cas de TC, associé à une diminution de la prévalence et de l'incidence de la toxoplasme en France nous ont conduit à réfléchir avec Santé Publique France à notre positionnement si une demande de révision de la politique de prévention de cette maladie était formulée par l'HAS (comme cela avait été fait en 2009).

Ce système de surveillance des toxoplasmoses congénitales est d'ailleurs unique en Europe et témoigne de l'importance de la France dans le domaine d'étude de cette affection.

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 et semestriellement pour les autres (1-2 cas par an). De plus, une newsletter est adressée par mail à tous les correspondants du réseau « Toxosurv », elle présente les informations recueillies dans l'année écoulée (avec le logigramme sur la sévérité de la toxoplasmose congénitale) et rappelle les impératifs du système de surveillance (Annexe 5). L'ensemble des résultats est transmis aux membres du réseau Toxosurv et des données sont extraites et mises en ligne sur le site Internet du CNR (données Web)

### 3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Le CNR est le seul réseau de surveillance de l'épidémiologie des souches de toxoplasmes existant dans le monde. Les chercheurs du CNR Pôle Souches collaborent avec des équipes internationales pour apporter leur expertise dans ce domaine. En 2016, le Pôle Souches a ainsi contribué à la connaissance des génotypes circulant en Tunisie (1 type II responsable de toxoplasmose congénitale), en Belgique (12 type II responsables de toxoplasmose congénitale), au Danemark (23 échantillons de 22 patients, révélant plus de 60% de type II, 2 types III, et des génotypes atypiques et africains) et au Pays Bas (1 cas de toxoplasmose congénitale due à un type II).

Pour la contribution à la surveillance des cas de toxoplasmose congénitale en France, les technologies utilisées dans Voozadoo (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](http://www.ecdc.europa.eu/.../0907_TER_TESSy_Web_Service_Technical_Documentation_1.pdf)

Les données de surveillance sont transmises par Santé Publique France (InVS) à partir du rapport fait par le Laboratoire coordonnateur, les données de surveillance des toxoplasmoses congénitales de l'année 2014, analysées en 2015 ont été transmises en juillet 2016. Ces données recueillies en France sont les seules données valides et solides pour l'Europe, les autres états membres n'envoyant que des données parcellaires de surveillance (absence de recueil exhaustif des cas au niveau national).

### **3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

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 en collaboration avec Santé Publique France. 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, ceci est réalisé par le Laboratoire Pôle Souches notamment.

Un travail a été mené en 2012-2013 par l'InVS à partir des données de la surveillance des cas de toxoplasmoses congénitales (Toxosurv), des données des enquêtes nationales de prévalence (ENP) réalisées et de modélisation mathématique pour estimer la tendance dans les années à venir de l'évolution de la prévalence globale de la toxoplasmose et de son incidence. Lors des ENP la séroprévalence chez les femmes de 30 ans a régulièrement baissé passant de 54.3% en 1995 à 36.7 en 2010. Elle est estimée à 26.9% en 2020.

Chez les femmes de 30 ans, l'incidence est passée de 7.5/1000 (1980) à 2.4/1000 (2010) et pourrait être de 1.6/1000 en 2020, ces données ont été estimées par modélisation. Ces données pourraient conduire à revoir la politique de prévention de cette affection dans les prochaines années puisqu'un plus grand nombre de femmes séronégatives seront à

surveiller (vis-à-vis du risque de séroconversion) engendrant un surcoût des dépenses.

*Nogareda F, Le Strat Y, Villena I, De Valk H, Goulet V, Incidence and prevalence of T.gondii infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation, Epidemiol Infect 2014, 142, 1661-70.*

Il n'y a pas eu depuis ces travaux publiés en 2014, d'enquêtes spécifiques sur la prévalence toxoplasmique menées en France. Une nouvelle ENP a eu lieu en 2016 mais Santé publique France ne nous a pas encore donné les résultats.

## **4 Alerte**

### **4.1 Décrire la procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année**

Des échanges téléphoniques ou sous forme de réunion à Santé publique France peuvent avoir lieu lors de phénomènes particuliers (cas groupés ou phénomène épidémiologique anormal) :

- soit sur l'initiative du CNR : lorsque le Pôle Souches repère des souches très particulières isolément ou en fréquence accrue par rapport aux années antérieures faisant suspecter un mode de contamination particulier, le CNR alerte Santé publique France.
- soit à la demande de Santé publique France (lors de notification de TIAC impliquant potentiellement des aliments contaminés par *Toxoplasma gondii*).

Il n'y a pas eu en 2014 d'alerte spécifique liée aux souches, ni de TIAC déclarée due à *Toxoplasma gondii*.

### **4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux**

Le CNR de la toxoplasmose n'a pas été impliqué en 2016 dans l'analyse de cas groupés. Du fait de la forme asymptomatique ou pauci-symptomatique des toxoplasmoses chez l'immunocompétent, les cas groupés de toxoplasmose sont difficiles à identifier. Les épidémies récentes de toxoplasmoses identifiées par le CNR ont été listées dans le rapport de 2016 (AO Renouvellement des CNR). Des articles ont été publiés.

*Ginsbourger M., Guinard A., Villena J., King L.A., El-Eid N., Schwoebel V. Toxi-infection alimentaire collective à Toxoplasma gondii liée à la consommation d'agneau, Aveyron (France), novembre 2010., Bull. Epidemiol. Hebd., 2012, 16-17, 195-7.*

*Abdelkrim Aroussi, Philippe Vignoles, François Dalmy, Laurence Wimmel, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier and Daniel Ajzenberg. Detection of Toxoplasma gondii DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. Parasite, 2015,22,14.*



## **5 Activités d'information, de formation et de conseil**

### **5-1 Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires**

#### **CHU Amiens**

##### **Enseignement**

- Cours sur la toxoplasmose : 3ème année de médecine (2 heures)
- Cours Ecole de Sages-femmes (2 heures)
- Cours Institut de Formation des techniciens de laboratoire d'analyses médicales (4 heures)

#### **CHU Angers**

##### **Enseignement**

- DES de Biologie Médicale, Module de Parasitologie – Mycologie, séminaires locaux sur le thème de la toxoplasmose (4h de cours ; 4h de TD), UFR de Santé, Université d'Angers, Département Médecine
- Enseignement dans le cadre de l'UE « Grossesse » prévention et diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (2h de cours), UFR de Santé, Université d'Angers, Département Pharmacie
- DUT, Analyses Biologiques et Biochimiques, Modules Immunologie (M3.1.BO2) et Parasitologie-Virologie (M 4.2.BO1-C) : diagnostic biologique de la toxoplasmose (2h de cours; 2h de TD; 14h de TP), IUT, Université Angers, Département Génie Biologique
- Licence Professionnelle Biologie analytique et expérimentale des micro organismes du végétal et de l'animal : détection de micro-organismes par biologie moléculaire (2h de cours), IUT, Université Angers, Département Génie Biologique

##### **Formation**

- Formation des internes à la validation biologique des dossiers de toxoplasmose (notamment dans le cadre des expertises sérologiques) : 2h/semaine en moyenne
- Accueil stagiaire, DUT Génie Biologique, Option Analyses Biologiques et Biochimiques : Marine Caillet (10 semaines, Avril – mi-juin 2016) « Introduction d'un automate pour la réalisation des techniques de western-blot et participation à l'accréditation de la sérologie de la toxoplasmose »

#### **CHU Besançon**

##### **Enseignement**

- Cours et TP aux étudiants en Médecine en DCEM 1
- Enseignement aux internes en DES biologie médicale
- Cours Ecole de Sages-femmes

#### **CHU Bordeaux**

##### **Enseignement**

- Cours magistral et enseignement dirigé, DGFSM3, UFR médecine Université Victor Ségalen
- Cours magistraux sur la Toxoplasmose : 4ème et 5ème années collège Santé UFR de pharmacie UE Microbiologie Spécialisée (2 h)
- Cours magistral et formation pratique au Laboratoire, DES de parasitologie et Mycologie Médicales, internes médecine et pharmacie, UFR médecine et faculté de pharmacie, Université Victor Ségalen
- Cours « Les toxoplasmoses : Outils et Diagnostic moléculaires », DES de Biologie médicale (1 heure)
- Cours théorique et analyse critique d'articles :
- « Cycle lytique de *Toxoplasma gondii* » Master 1 Microbiologie – Immunologie, UE Interactions Hôtes–Pathogènes (4 h)  
« Réponse immunitaire et facteurs de virulence de *Toxoplasma gondii* » Master 2 Recherche Biologie Santé U.E. relations hôtes-agents infectieux (4 h) Collège Santé et

Collège Sciences et Technologies, UFR Sciences biologiques, UFR Sciences de la vie, Université de Bordeaux

- EPU « maladie infectieuse et grossesse » organisé par le CPDNP (centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal) du CHU de Bordeaux
- EPU en gynécologie, Paris, (14-15 octobre 2016) « Controverses sur le dépistage et le traitement de la toxoplasmose pendant la grossesse. »
- EPU « infections congénitales à *Toxoplasma gondii* et à cytomégalovirus (CMV) : diagnostic pré et post-natal, interprétation clinico-biologique et modalités de prise en charge », Association Biologiste d'Aquitaine, (ABA)

### **CHU Brest**

#### **Enseignement**

- Cours aux internes DES (9 heures) – Epidémiologie et Diagnostic biologique de la toxoplasmose
- Travaux pratiques Ecole de Sages-femmes SF3 (1 heure) – Cas cliniques sur le diagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte
- Cours Ecole de Sages-femmes SF4 (2 heures) – Cas cliniques sur le diagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte
- Cours DFGSM3 (2 heures) – La toxoplasmose

### **CHU Caen**

#### **Enseignement**

- Etudiants en médecine (L3) : 1 heure de Cours magistral sur la toxoplasmose
- Etudiants en maïeutique : 1 heure sur la toxoplasmose

#### **Formation**

- Formation des Internes (validation des méthodes, interprétation, CAT)

### **CHU Dijon**

#### **Enseignement**

- Deuxième cycle (2ème année) des Etudes Médicales, Faculté de Médecine, Dijon
- Cours de Parasitologie – 4ème année de Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Dijon
- DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Dijon
- Cours Ecole de Sages-femmes

### **CHU Fort de France**

#### **Enseignement**

- Cours Ecole de Sages-femmes 2ème année

### **CHU Grenoble**

#### **Enseignement**

- Deuxième cycle (3ème, 4ème, 5ème, 6ème années), Etudes Médicales, Faculté de Médecine
- DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie)
- Master 2 Ingénieries pour la Santé et le Médicament, Méthode de recherche en environnement-Santé-Ecotoxicologie, « Lutte contre les agents infectieux », Université Grenoble Alpes, Grenoble
- UE « diagnostic in vitro ». Master Ingénierie pour la Santé et le Médicament, Université Grenoble Alpes, Grenoble
- UE « Physiopathologie des Maladies Transmissibles », UE Bio 42b, Master Sciences du Vivant, Université Grenoble Alpes, Grenoble
- UE « Infectiologie », UE Bio 4416, Master Sciences du Vivant, Université Grenoble Alpes, Grenoble
- UE L2 Biotech, UE Bio 243, Ecole des Biotechnologies, Université Joseph Fourier
- Diplôme d'Université « Thérapeutiques anti-infectieuses », Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, Grenoble
- EPU aux professionnels de santé (généralistes, biologistes)

### Expertise

- HP membre du board de l'European Study Group for Clinical Parasitology de l'ESCMID, contact person du Toxoplasma subgroup. Membre français du Scientific Affairs Subcommittee de l'ESCMID

### **CHU Lille**

#### Enseignement

- Cours «Toxoplasmose» en MED 3, (1 heure) Université Lille 2
- Cours au DU Pathologies infectieuses de la femme, de la mère et du nouveau-né : « Toxoplasmose chez la femme enceinte et en néonatalogie », Faculté de Médecine, Lille
- Cours de DES de Biologie Médicale, spécialité Parasitologie Mycologie : « Toxoplasmes et Toxoplasmose » et TP centrés sur les protozoaires tissulaires

### **CHU Limoges**

#### Enseignement

- Médecine 1er cycle (DFGSM3) : 2 heures (D. Ajzenberg)
- Maieutique : 3 heures (JB Murat)
- DES Biologie médicale : 2 x 3 heures théoriques
- Internes de biologie médicale : formation pratique en continue (ML Dardé)
- Formation aux techniques de génotypage du toxoplasme : Colombie (D. Ajzenberg)
- Accueil Stagiaire Master 1 Sciences de la Vie et de la Santé, Faculte des Sciences et Techniques de Limoges : Azra Hamidović, (Encadrant : JB Murat) ; « Approche épidémiologique de la diversité génétique du parasite Toxoplasma gondii en Haute-Vienne et en Creuse : à la recherche de l'haplogroupe 16 »

#### Accueil stagiaire étranger

- Tawin Inpankaew, Assistant Professor, Bangkok Thaïlande (3 mois) « Apprentissage des techniques d'isolement de souches d'origine animale »
- Nassim Ouchène, Algérie (2 semaines) « Isolement de souches d'origine animale »

### **CHU Marseille**

#### Enseignement

- Cours sur la toxoplasmose : DES biologie médicale (3 heures)
- Cours sur la toxoplasmose et leishmaniose : IFSI première année (2 heures)
- Cours sur la toxoplasmose : Etudiants en DFGSM2 (2 heures) et DFGSM3 (4 heures)

### **CHU Montpellier**

#### Enseignement

- Deuxième cycle des Études Médicales, Faculté de Médecine, Montpellier
- Enseignement Module Intégré E : Pédiatrie, Gynécologie-Obstétrique (2ème cycle des études médicales) : Prévention, diagnostic et suivi des infections per-placentaires et du per-partum : le bon usage des examens biologiques
- Toxoplasmose : Enseignement au DES de Biologie Médicale
- Toxoplasmose et grossesse : Cours et Enseignement Dirigé à l'Ecole de Sages-femmes (F. Pratlong)
- Enseignement sur la toxoplasmose à des étudiants infirmiers 2ème année : « Découverte des métiers » (F. Pratlong)

### **CHU Nancy**

#### Enseignement

- Cours sur la Toxoplasmose : FGSM1 - (1 heure)
- Cours sur la toxoplasmose : Ecole de Sages femmes (L1)

### **CHU Nantes**

#### Enseignement

- Enseignement en médecine (DFGSM3)
- DES de biologie médicale

## **CHU Nice**

### **Enseignement**

- Cours sur la toxoplasmose et parasitoses et facteurs de risque (l'exemple de la toxoplasmose aux étudiants en Médecine en L3 de la Faculté de Médecine de Nice. (Pierre Marty 2 heures)
- Cours sur la toxoplasmose aux étudiants en première année de l'Ecole de Sages-Femmes du CHU de Nice. (P.Marty 1 heure)
- 27/01/2016 – Nice. Diplôme Inter-Universitaire (Nice, Marseille, Montpellier) de Médecine Fœtale. Toxoplasmose pour le Parasitologue. (Pierre Marty 1 heure), Toxoplasmose suivi pédiatrique. (N. Ferret 1 heure)
- 12/10/2016 – Clamart. Hôpital Antoine Béclère, Université Paris XI. Cours au DU Pathologies infectieuses de la femme enceinte, du fœtus et du nouveau-né : Toxoplasmose, épidémiologie, cycle parasitaire, diagnostic biologique. (P. Marty 2 heures)
- 20/10/2016 – Mouans-Sartoux. Séminaire sur la toxoplasmose aux Biologistes du Laboratoire BioEstérel (C. Pomares, P. Marty)

### **Formation**

- Septembre 2015 à Août 2016 – Palo Alto Medical Foundation, California USA. Laboratoire de la Toxoplasmose. (Formation C. Pomares)

### **Expertise**

- Laboratoire relais ABBOTT. Expertise pour les clients ABBOTT travaillant avec la gamme de produits Toxoplasmose par réalisation d'analyses spécifiques et interprétation des résultats obtenus en cas de difficulté d'interprétation

## **CHU Paris Bicêtre**

### **Enseignement**

- Cours magistraux et enseignement DFGSM3
- Formation des Internes

## **CHU Paris Bichat**

### **Enseignement**

- Etudes pharmaceutiques, Faculté de Pharmacie Paris Descartes : 4<sup>e</sup> année, 5<sup>e</sup> année
- Bioforma, FCM, Faculté de Pharmacie Paris-Descartes, « Infections et grossesse »
- DES de Parasitologie, Université de Phnom Penh, Faculté de Pharmacie, Fondation Mérieux

## **CHU Paris Cochin**

### **Enseignement**

- DES de Parasitologie-Mycologie enseignement de la Toxoplasmose : Faculté de Pharmacie et Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris 6, Paris Diderot, cours et ED (4h)
- Unité d'enseignement Infectiologie, DFGSM3, enseignement de la Parasitologie : Faculté de Médecine Paris Descartes, cours et ED (1h30)
- EPU, 13<sup>ième</sup> Journée de Médecine Fœtal, Port-Royal, Paris, 20 mai 2016 : Prise en charge des séroconversions périconceptionnelles

## **CHU Paris St Denis**

### **Enseignement**

- ISI, Elèves infirmiers, : cours sur les maladies parasitaires

### **Formation**

- Etudiants en 5<sup>ème</sup> année de pharmacie (1 ou 2), 3 matinées par semaine

## **CHU Paris Pitié Salpêtrière**

### **Enseignement**

- Faculté de médecine Paris VI, UPMC
- Formation des Internes en DES de biologie médicale

- DU dermatologie tropicale et infectieuse
- DU médecine des voyages – santé des voyageurs
- Alger, février 2016 : troisième atelier pratique de gynécologie-obstétrique de Bologhine - Animation d'un atelier sur la sérologie de la toxoplasmose
- Décembre 2016 : animation de la soirée du réseau Artemis-medica sur les parasitoses chez les immunodéprimés

### **CHU Paris Saint-Louis, Université Paris Diderot**

#### **Enseignement**

- Unité d'enseignement "diagnostic microbiologique" du master Infectiologie Microbiologie, Virologie, Immunologie (IMVI) de l'Université Paris Diderot : cours sur le diagnostic immunologique et moléculaire des parasitoses et des mycoses

#### **Formation**

- Internes : cours + formation pratique à la lecture et à l'interprétation des résultats de sérologie et de biologie moléculaire

### **CHU Poitiers**

#### **Enseignement**

- DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Poitiers
- Cours sur la toxoplasmose : Ecole de Sages femmes (L2)
- Cours sur la toxoplasmose : Etudiants en médecine (L3) et aux étudiants en pharmacie

### **CHU Reims**

#### **Enseignement**

- Toxoplasmose et grossesse : Cours Ecole de sages-femmes
- Coursus médical (L3) Cours sur la Toxoplasmose (3h)
- Formation des Internes en Diplôme d'Etudes Spécialisés de Biologie Médicale avec Cours « Toxoplasmose » dispensé en commun aux Intemes de Amiens, Caen, Reims et Rouen
- M1 Zoonoses Limoges (Protozoaires transmis par les aliments, I. Villena, 4h)
- M1 Santé : Enseignement sur la toxoplasmose : «Déterminants de l'hôte sur l'expression clinique et stratégies développées par le parasite pour échapper au système de défense de l'hôte», UFR Médecine, La Pitié Salpêtrière (06/01/2016)
- M1 Santé : Cours et TD sur « Mécanismes d'invasion et facteurs de virulence chez T. gondii ; Physiopathologie des interactions cellules-parasite : exemple des Apicomplexa ». (I. Villena, D. Aubert, 14h)
- M2 Recherche : Cours et TD sur « Stratégies développées par les parasites pour échapper aux défenses de l'hôte ; mécanismes de résistance phénotypiques et génotypiques chez T. gondii ; Mécanismes d'invasion et facteurs de virulence chez T. gondii » (I. Villena, D. Aubert, 8h)

#### **Formation**

- Accueil stage Master 1 : Marie Bonzom (avril –juin 2016) «Expérimentations de protocoles d'extractions d'ADN sur différentes matrices »
- Accueil stage de recherche Master 2 : ; Sophie Chagneau (décembre 2015 – mai 2016) : « Développement d'une méthode in vitro pour déterminer la viabilité et l'infectiosité des oocystes de Toxoplasma gondii »
- Accueil Stage DUT: Simon Duchateau (avril – juin 2016) « Screening et tests de chimiosensibilité de molécules de la Pathogen Box sur des souches de Toxoplasma gondii»

#### **Thèses Université en cours :**

- Julie Simon (octobre 2013-février 2017) : Etude de la distribution spatiale de la contamination environnementale par Toxoplasma gondii au niveau des fermes en lien avec le comportement de défécation des chats »
- Mathieu Bastien : (octobre 2013-mai 2017) « Contamination parasitaire des terrains maraîchers par Echinococcus multilocularis, Toxocara spp. et Toxoplasma gondii dans le Nord-Est de la France»

- Jérémy Spalenka (décembre 2014 – décembre 2017) : « Chimiosensibilité de *Toxoplasma gondii* à des substances et extraits naturels »

#### Expertise

- Laboratoire relais ABBOTT. Expertise pour les clients ABBOTT travaillant avec la gamme de produits sur la Toxoplasmose (réalisation d'analyses spécifiques et interprétation des résultats obtenus en cas de difficulté d'interprétation)
- Expertise des sérologies à problèmes pour les LABM

### **CHU Rennes**

#### Enseignement

- DFGSM3 : TD/TP (2h)
- DES de Biologie Médicale : cours (4h/semestre), cas cliniques (4h/semestre), et formation pratique continue
- Diplôme Universitaire de Médecine Tropicale et humanitaire (Faculté de Médecine Rennes) : Cours « Toxoplasmose en zone tropicale » (1h30)
- Master 1, UE6A « Microbiologie fondamentale et Santé : bases expérimentales de la virulence des agents infectieux » (Rennes) : Conférence « Circulation de *Toxoplasma gondii* chez ses hôtes intermédiaires : virulence parasitaire et réponses adaptatives de l'hôte » (2h)
- Master 1, UE « Parasitologie et Mycologie fondamentales et appliquées » (Brest) : Conférence « *Toxoplasma gondii* : aspects épidémiologiques, approche de la virulence et de l'interaction hôte-parasite » (2h)
- Master 2, Domaine « Science, technologie, Santé » mention Biologie, spécialité Génomique Fonctionnelle et Santé (UE « Interactions cellulaires et moléculaires hôte-pathogène » (Rennes) : Conférence: « *Toxoplasma gondii* : invasion cellulaire et interactions hôte – parasite » (1.30h)

#### Formation

- Encadrement de stage d'externe en médecine « UE stage en laboratoire » : mémoire : « A propos d'un cas de toxoplasmose congénitale »
- Encadrement d'un stage de Master 1 : « Prévalence du portage de kystes hépatiques de *Toxoplasma gondii* : étude sur modèle murin »

#### Expertise

- Coordination d'un projet européen dans le cadre de l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology & Infectious Diseases) : Recensement des pratiques de prévention et incidence de la toxoplasmose chez les greffés d'organes et de cellules souches hématopoïétiques

### **CHU Rouen**

#### Enseignement :

- Enseignements de Parasitologie de l'UFR Médecine et Pharmacie avec :
- Cours toxoplasmose, DCEM1, Faculté de médecine de Rouen (commun école Sages-Femmes)
- Cours toxoplasmose 3ème année Pharmacie, Faculté de Pharmacie de Rouen
- Cours toxoplasmose, DUT Evreux
- Cours toxoplasmose Institut de formation en soin infirmier chu Rouen

### **CHU Strasbourg**

#### Enseignement

- Module de Parasitologie en DCEM1
- Module de Maladie Infectieuse en DCEM 2
- Master Vie et Santé, spécialité Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire
- Module optionnel de « Stratégie des examens de laboratoire » (Responsable de l'organisation de l'enseignement)
- Module optionnel de « Modèles animaux »
- Module optionnel « Médecine et environnement »

- Externes en médecine et en pharmacie en stage de laboratoire : charge d'encadrement estimée à 20 heures annuelles sur la toxoplasmose
- Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement (eau et parasites)
- UFR d'Odontologie : 1ère année d'Odontologie (parasitologie et mycologie médicale)
- DES de biologie médicale : Enseignement intégré sur la Toxoplasmose (2 heures)
- Cours à l'Ecole de Sages-Femmes sur la Toxoplasmose
- Diplôme Universitaire de Pathologie Tropicale de l'ULP (DU et DUI)
- Formation médicale continue : Bio Format et FMC de l'UDS
- Stratégie de l'exploration biologique des infections materno foetales : toxoplasmose, (module optionnel du 2ème cycle des études médicales)
- Enseignement Post Universitaires, Laboratoire Biogroup, 1 heure

## **CHU Toulouse**

### **Enseignement**

- Cours magistraux Ecole de Sages-femmes, Toulouse
- Cours magistraux et Enseignement Dirigé au DES de Biologie Médicale
- Cours magistraux et enseignement dirigé DFGSM3 UPS, Facultés de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil
- Cours M1 « Physiopathologie des infections », Thème « Infections à transmission materno-foetale »
- Cours M2 Pro « Diagnostics Microbiologiques », Thème : Techniques de diagnostic en Parasitologie (dont Toxoplasmose) et Mycologie
- Formation des internes à la validation biologique de la Toxoplasmose : diagnostic sérologique et moléculaire

### **Formation**

#### **Thèse d'exercice de Biologie Médicale**

- C, Armengol, Comparaison de spet réactifs commerciaux pour le diagnostic de séroconversion toxoplasmique chez la femme enceinte au CHU de Toulouse

## **CHU Tours**

### **Enseignement**

- Formation des Internes en Diplôme d'Etudes Spécialisés de Biologie Médicale avec Cours « Toxoplasmose et Sérodiagnostic de la toxoplasmose »
- Formation des Externes en pharmacie en stage de laboratoire : Cours « Toxoplasmose » et formation au sérodiagnostic de la toxoplasmose
- Formation des étudiants Techniciens de laboratoire médical : Cours « Toxoplasmose » et Travaux pratiques sur le sérodiagnostic de la toxoplasmose

## ***Nouveaux centres à compter de 2017***

### **CHU Clermont Ferrand**

#### **Enseignement**

- Médecine 3ème année, cours sur la toxoplasmose : 2 heures
- Maïeutique 2ème année : 2 heures

### **CHU Lyon**

#### **Enseignement**

- Médecine 2er cycle (DFGSM) : 3 heures
- Maïeutique : 6 heures
- Cours IFSI : 1 heure
- Cours Techniciens de laboratoire : 2 heures
- Formation des internes du service : 2 heures par mois

## 5-2 Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques a été élaboré par les membres du CNR sous la forme d'un article (O. Villard et al., Feuillet de Biologie, 2011) et de logigrammes à destination des laboratoires de Biologie Médicale qui sont en charge du diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Les recommandations du CNR ont ensuite été publiées dans un journal international en 2016 (O. Villard et al. *Serological diagnosis of Toxoplasma gondii infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, 84, 22-33).

Ces documents sont appuyés à nos évaluations de réactifs de diagnostic sérologique :

- Techniques d'agglutination (O. Villard et al., *Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, 73, 231-5).

- Techniques de détermination de l'avidité des IgG toxoplasmique (O. Villard et al., *Comparison of four commercially available avidity tests for Toxoplasma -specific IgG antibodies. Clin. Vaccine. Immunol.*, 2013, 20, 197-204).

- Techniques automatisées (O. Villard et al. *Help in the choice of automated or semiautomated immunoassays for serological diagnosis of toxoplasmosis: Evaluation of nine Immunoassays by the French National Reference Center for Toxoplasmosis. J.Clin. Microbiol.* 2016, 54, 3034-42).

**L'ensemble des publications du pôle de sérologie est en ligne sur le site internet du CNR et les professionnels de santé peuvent s'y référer et le cas échéant contacter les laboratoires membres du réseau du CNR pour une aide à l'interprétation de sérologies compliquées, nécessitant un avis expert.**

## 5-3 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

### 5.3.1 Rétro-information aux partenaires :

- **Une réunion annuelle** a lieu chaque année, organisée par le **Laboratoire Coordonnateur** conviant l'ensemble des membres du CNR pour présenter le bilan de l'activité de chacun des Pôles et les perspectives de l'année suivante, cette réunion est l'occasion d'une discussion entre tous les membres du CNR. Elle s'est déroulée le 13.10.2016 à Paris. Le Laboratoire Coordonnateur envoie (par courriel) le compte-rendu de cette réunion ainsi que toutes les présentations effectuées à tous les membres du CNR.

- Le **Laboratoire Coordonnateur** envoie également le **rapport d'analyse** de la surveillance des toxoplasmoses congénitales en France à tous les membres du CNR et ceux du réseau Toxosurv (incluant l'ensemble des laboratoires correspondants participant à cette surveillance, Annexe 4), une fois ce rapport validé avec Santé Publique France. Cet envoi a eu lieu le 6/04/2017 (en raison d'une exploitation des résultats de la base plus tardive que les années précédentes). Une newsletter est également adressée avec le rapport (Annexe 5).

- **Le Laboratoire Associé Pôle Souches** envoyait le **compte-rendu individuel du résultat du génotypage pour chaque isolat** (souche ou ADN) adressé au CNR.

Depuis septembre 2015, le logiciel Toxosurv (Epiconcept) déjà développé pour la déclaration des cas de toxoplasmose congénitale a été adapté pour que les centres puissent rentrer les données associées aux isolats d'origine congénitale ou acquise qu'ils envoient au CNR (autorisation CNIL n° 915126). En retour, ce même logiciel permet à l'équipe du CNR Pôle Souches d'informer les partenaires des génotypes obtenus. Un compte-rendu détaillé du génotypage est associé à chaque souche ou ADN.

Une information plus globale du bilan annuel est présentée lors de la réunion annuelle du CNR.

Les partenaires sont associés comme auteurs ou dans les remerciements des publications du CNR Pôle Souches.



- **Le Laboratoire Associé Pôle Sérologie** communique **les résultats des enquêtes réalisées** sur les réactifs aux membres du CNR lors de la réunion annuelle du CNR. Il propose des publications associant l'ensemble des membres du CNR après recueil des avis des membres.

- **Le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire** communique **les résultats des différentes enquêtes menées** :

a) Les résultats du Contrôle de Qualité Externe National de biologie moléculaire sont rendus par courrier de façon personnalisée. Depuis 2015, **le CQnat s'est doté d'un site web pour le rendu des EEQ et pour la saisie des enquêtes sur les pratiques** (voir : CQnatToxo), accès réservé aux membres du CNR participant au contrôle de qualité. En 2017, le site sera enrichi d'une page personnelle pour chaque laboratoire participant, où les attestations de participation seront accessibles.

b) Enquêtes sur les pratiques et les méthodes utilisées en diagnostic moléculaire

Le Pôle Biologie moléculaire du CNR continue à demander aux centres participants au CQE, en contrepartie de sa gratuité, à répondre à un questionnaire sur ces pratiques et méthodes. Afin de répondre aux exigences des normes ISO 15189 et 17043, ce questionnaire, ainsi que celui du rendu des résultats du CQE, est maintenant passé en ligne et accessible via un site internet protégé par un mot de passe.

Un bilan des enquêtes de pratiques de 2008 à 2015 est en cours de rédaction.

### 5.3.2 Diffusion aux professionnels : conférences, site internet

- Des conférences sont faites par différents membres du CNR lorsqu'ils sont sollicités, ils sont souvent les référents régionaux en matière de diagnostic et de recherche sur la toxoplasmose (voir paragraphe formation et communications).

- Un site internet du CNR a été créé dès la mise en place du CNR (2007) par le Laboratoire Coordonnateur (<http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr>), 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, articles publiés par le CNR), les rapports annuels d'activités sont mis en ligne sur le site Internet une fois validés par Santé Publique France. Des données synthétiques sur la surveillance de la toxoplasmose congénitale sont mises à jour chaque année, le choix de ces données a été fait en collaboration entre le CNR et Santé Publique France.

Depuis 2015, le site internet présente une version anglaise. **Un lien vers le site de Santé Publique France est fonctionnel.**

Données disponibles sur le web :

1/ définition des cas + réseau Toxosurv

2/ nombre de déclaration de TC pour 12 mois et lien BEH

3/ indicateurs remarquables : x cas /1000 naissances (calcul selon le nombre de naissances)

4/ carte correspondant à la répartition par région

5/ Nombre de cas de TC selon le terme de la grossesse lors de l'infection maternelle (diagramme)

6/ Nombre de TC selon âge des mères accouchant en France (ratio TC/ Nombre accouchements)

7/ Logigramme récapitulatif des cas

Pour répondre à une demande de nombreux laboratoires d'analyses français ou de professionnels de santé (gynécologues obstétriciens en particulier), **une liste des techniques de diagnostic sérologique et moléculaire** de la toxoplasmose ainsi que des responsables au sein des laboratoires experts du CNR a été élaborée et est disponible sur le

site internet du CNR, **cette liste est mise à jour annuellement (dernière mise à jour le 16/03/2017).**

Afin d'améliorer la présentation du site et d'y déposer des documents spécialisés réservés aux professionnels de santé, la configuration du site a été revue fin 2012 avec mise en place d'un accès réservé aux membres du CNR par mot de passe.

La secrétaire du Laboratoire Coordonnateur assure la maintenance et la mise à jour du site internet en lien avec le responsable du CNR. Les membres du CNR peuvent adresser des documents qu'ils souhaiteraient déposer (publications, conseils...).

Un site web pour le CRB Toxoplasma a été créé en 2008 (<http://www.crb.toxo.com>), hébergé par le CHU de Reims, il présente un lien avec le site du CNR. Ce site présente notamment un catalogue de toutes les souches disponibles pour la recherche et les formulaires de demande à envoyer aux responsables du CRB.

#### **5-4 Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)**

- Le CNR est organisé pour réceptionner tout mail relatif à la surveillance des toxoplasmoses congénitales par la mise en place d'une adresse spécifique ([toxosurv@chu-reims.fr](mailto:toxosurv@chu-reims.fr)) avec réception par I Villena (responsable) et C Delmas (ARC du CNR) qui visualisent ainsi les messages (archivés par l'ARC) et répondent aux questions relatives au fonctionnement du système.

En 2016, cette adresse a géré 260 demandes d'information pour les membres du réseau (majoritairement) et les des professionnels de santé.

- Chaque membre du CNR est amené à répondre individuellement pour des avis en matière de diagnostic ou de traitement lorsqu'il est sollicité, ils sont souvent les référents régionaux pour cette affection et à ce titre reçoivent des appels de professionnels de santé ou patients.

#### Activité de conseil pour le diagnostic sérologique:

Un premier questionnaire d'autoformation de 30 questions avait été mis en place en 2015 associé à la campagne de l'ANSM 15PAR1 auprès des 844 laboratoires inscrits. Seuls 171 laboratoires avaient répondu soit une participation de 20%. Face à la très faible participation, **un deuxième questionnaire d'autoformation comportant 20 questions** (réponses VRAI-FAUX) **a été envoyé en 2016 associé à la campagne EEQ 16PAR1** avec une obligation de répondre pour valider les résultats de l'EEQ.

Bonnes réponses	LBM Ville 537		LBM Hôpital 277		Global 816	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%
≥ 95%	7	35	7	35	6	30
90-95%	4	20	4	20	5	25
80-90%	1	5	3	15	3	15
< 80%	8	40	6	30	6	30
> 80%	12	60	14	70	14	70

La participation est de 94,1%. Sur les 844 laboratoires inscrits au programme sérologie toxoplasmose, 794 ont répondu. On note que 22 laboratoires non-inscrits ont également répondu (formulaire accessible aux LBM inscrits en parasitologie mais pas en sérologie, soit un total de 816 participants.

L'analyse des réponses ne montre pas de différence majeure entre les LBM de ville et hospitalière. Entre 60 et 70% des laboratoires ont plus de 80% de bonnes réponses.

Pour les 8 questions dont le score de bonne réponse est inférieur à 80% le pôle sérologie du CNR a rédigé une réponse détaillée qui a été adressée à l'ensemble des laboratoires par l'ANSM.

L'analyse détaillée montre que les questions aux scores les plus faibles concernent le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (5 questions) à la naissance et dans le suivi de l'enfant. Deux questions concernent l'avidité des IgG toxoplasmiques et son apport dans la datation d'une sérologie en présence d'IgG et d'IgM positives. La dernière question concerne la valeur des IgM positives dans la détermination de l'évolutivité d'une infection. Pour toutes ces questions, les scores des laboratoires hospitaliers sont supérieurs avec une différence de moins de 5% pour les questions sur les IgM et l'avidité des IgG. Si la prise en charge d'une suspicion de toxoplasmose congénitale, son diagnostic à la naissance et son suivi sérologique est du domaine de laboratoires experts, en revanche la place des IgM et de l'avidité des IgG dans le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive doit être parfaitement intégrée dans une pratique de dépistage et de suivi des femmes enceintes dans les LBM de ville.

**Le prochain questionnaire d'autoformation fera une part importante sur ces aspects afin d'améliorer les performances** des laboratoires en termes de connaissances et d'interprétation de ces paramètres essentiels dans le diagnostic sérologique d'une toxoplasmose évolutive et de sa prise en charge qui en découle.

Activité de conseil pour le diagnostic par Biologie Moléculaire :

- Recommandations sur le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (à l'attention des professionnels de santé) : mise en ligne sur le site du CNR
- Recommandations « techniques » par téléphone ou par courriel au cas par cas, selon les demandes des professionnels.

**5-5 Activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de Santé publique France, des autres agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structures européennes (ECDC, ...) ou internationale (OMS, ...)**

Expertise ML Dardé (Labo associé Souches)

- Expert auprès de l'ECDC
- Expert ANSM

Expertise I. Villena (labo Coordonnateur)

- Expert ANSES : I. Villena, expert CES Biorisk (depuis 2013).
- Membre du conseil scientifique et comité éditorial pour les revues Spectra Biologie et Annales de Biologie Clinique. Membre du comité de rédaction du BEH depuis 2013.
- Membre de l'European Study Group for Clinical Parasitology de l'ESCMID, co-responsable du Toxoplasma subgroup avec H Pelloux.

Expertise membres des groupes de travail du CNR (Laboratoires associés)

- Pr Hervé Pelloux : membre du board de l'European Study Group for Clinical Parasitology de l'ESCMID, contact person du Toxoplasma subgroup.
- Dr Laurence Delhaes : membre du Comité Scientifique des CNR de l'INVS
- Pr Florence Robert-Gangneux : Membre français du Scientific Affairs Subcommittee de l'ESCMID

- Plusieurs membres du CNR continuent d'être impliqués dans un travail de fond réalisé pour la DHOS concernant les cotations des actes de biologie dans la nomenclature et hors-nomenclature pour la toxoplasmose. Tous les aspects du diagnostic sont considérés (sérologique, moléculaire, inoculation à la souris).

**En 2016, l'HAS (Service évaluation des actes professionnels) a sollicité le CNR de la Toxoplasmose en vue de la rédaction d'un rapport** sur le Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire. Trois des membres responsables du CNR (P.Bastien, E.Candolfi et I Villena) ont participé à une audition par l'HAS pour répondre aux interrogations sur « l'évaluation des tests diagnostiques de la toxoplasmose » et argumenter les analyses proposées dans le cadre de

ces diagnostics. **Le rapport a été publié par l'HAS en Février 2017, il a été mis sur le site internet du CNR avec l'accord de l'HAS.**

**En 2017, un deuxième rapport** sur le Diagnostic biologique de la toxoplasmose chez les Immunodéprimés, sera rédigé avec la collaboration du CNR et des mêmes trois membres.

Ces rapports devraient être utiles pour la révision de la nomenclature des actes de biologie médicale conduite par l'ANSM.

## **6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR**

### **6.1 Activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.**

Tous les laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose participent à au moins un des deux PHRC nationaux en cours sur la toxoplasmose (voir rapports antérieurs et rapport pour le renouvellement des CNR rendu en 2016).

**Participation au PHRC national TOXOGEST :** Essai clinique randomisé, multicentrique comparant l'efficacité et la tolérance d'un traitement prénatal par l'association pyriméthamine-sulfadiazine versus spiramycine sur la réduction de la transmission verticale de de *T. gondii* après primo-infection pendant la grossesse. Investigateur principal : L. Mandelbrot, AP-HP, Paris. Le PHRC est terminé et nous en sommes au rapport d'analyse des résultats visant à déterminer les taux de transmission dans les deux bras. I Villena fait partie du comité scientifique de ce PHRC et participe à l'évaluation des résultats, rapport prévu pour l'année 2017.

**Participation au PHRC national TOSCANE :** Etude multicentrique, randomisée de non infériorité de deux stratégies thérapeutiques chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale. Investigateur principal : Pr. JB Gouyon, Dijon. Cet essai inclut des enfants atteints de toxoplasmose congénitale sans lésion oculaire et traités initialement pendant trois mois. Selon le bras d'inclusion, le traitement est soit arrêté (traitement court), soit prolongé pendant 9 mois (traitement long) par l'association pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar®). L'évaluation portera principalement sur la survenue de lésions oculaires à l'âge de 5 ans. L'essai est encore en cours puisque les inclusions ont été prolongées du fait du faible effectif d'enfants recrutés annuellement. I Villena fait partie du comité scientifique de ce PHRC.

#### **6.1.a Pôle Épidémiologie :**

Le Laboratoire Coordonnateur centre ses thématiques de recherche au sein d'une équipe de recherche labellisée par le Ministère (EA3800, Pr Villena) sur la thématique : «Protozoaires transmis pas l'alimentation : biodiversité et pathogénie», selon une déclinaison en deux volets d'étude. Cette EA est co-labellisée par les Universités de Reims et Rouen puisqu'elle associe des enseignants chercheurs des deux sites (deux laboratoires de Parasitologie membres du CNR).

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

Objectif Général : comprendre la dynamique de circulation des protozoaires dont *T gondii*

1-1 Etude de la contamination des matrices carnées : 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. Voir point « 7.1 Coopération avec les laboratoires de santé animale dont les LNR ». Les rapports ont été rendus à la DGAL à la fin de chaque plan ; une publication pour le Bulletin Epidémiologie Santé animale de l'Anses et la DGAL a été réalisée en collaboration avec les équipes de l'Anses, du CNR et de la DGAL, elle fait le bilan des différents plans de surveillance Toxoplasma dans les viandes de boucherie depuis 2007. Une autre publication a également été rédigée dans le cadre plus large des réservoirs animaux pour la toxoplasmose.

*Blaga R., Aubert D., Thébaud A., Perret C., Geers R., Thomas M., Alliot A., Djokic V., Ducry T., Ortis N., Halos L., Durand B., Danan C., Villena I., Boireau P. Etude de la contamination par Toxoplasma*

*gondii* des viandes ovines, bovines et porcines – résultats des plans de surveillance pour les années 2007, 2009 et 2013. Bull. Epidémiol. Santé Anim. et Alimen. n°69, 2015, 15-19.  
Blaga R., Aubert D., Perret C., Geers R., Djokic V., Villena I., Gilot-Fromont E., Mercier A., Boireau P. Animaux réservoirs de *Toxoplasma gondii* : état des lieux en France. Revue Francophone des Laboratoires, n°477, 2015, 31-48.

1-2 L'étude de la contamination d'autres matrices alimentaires par *T. gondii* a été 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 a été clôturé en 2014 avec remise d'un rapport final à l'ANR et plusieurs publications.

Nous continuons ces travaux dans le cadre d'une Unité Mixte Technologique (UMT) « Protorisk » associant le centre technique ACTALIA. UMT est un outil de partenariat entre un institut technique et une unité de recherche publique, mis en place et soutenu par le ministère chargé de l'Agro-alimentaire sous la coordination de l'ACTIA, structure nationale qui fédère les activités des Instituts techniques de l'agro-alimentaire (<http://www.actia-asso.eu/>). Nous développons des techniques de détection des protozoaires (dont *T. gondii*) au sein de matrices (salades, framboises, herbes aromatiques).

1-3 L'étude de la contamination des mollusques bivalves par *Toxoplasma gondii* est également réalisée dans le cadre d'un programme de recherche soutenu par l'Anses avec convention entre le Laboratoire de Reims, l'Anses et l'Ifremer. Ce programme vise à la mise en place d'outils de détection sensibles et rapides de la contamination par les trois parasites d'intérêt *T. gondii*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, puis à la réalisation d'un plan d'échantillonnage pour détection sur le terrain (zones maritimes) avec l'Ifremer. La mise au point des méthodes de détection a été faite en 2014 et une étude sur le terrain a été réalisée sur des sites choisis et prélevés par l'Ifremer : six sites de prélèvements différents sont suivis mensuellement pendant 12 mois avec recherche des virus et des trois parasites considérés. Des échantillons ont été retrouvés positifs pour les parasites (dont *T. gondii*).

1-4 La partie relative à l'étude de la contamination du sol et à la circulation des oocystes a été étudiée dans le cadre de plusieurs 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* a ensuite été 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, 2013 et thèse Forin-Viard MA, 2014). Une thèse a ensuite poursuivi le travail de contamination des sols en fonction des populations de chats (thèse J Simon, 2016). L'équipe de Limoges (Pr Dardé) collabore également à ce programme de recherche en génotypant les isolats collectés.

- Une thèse est également en cours sur l'étude de la contamination des potagers par trois parasites d'intérêt médical dont *T. gondii* en région Ardenne et Lorraine (Thèse M Bastien 2017).

Titre : Caractérisation du risque de contamination des terrains maraichers par des parasites zoonotiques à transmission alimentaire : *Toxoplasma gondii*, *Echinococcus multilocularis* et *Toxocara sp.*

Objectif : caractériser les potagers à risque de transmission parasitaire et identifier des mesures de prévention à préconiser.

Cette caractérisation a fait l'objet d'une étude préliminaire qui a mis en évidence l'importance du dépôt de fèces de chats, chiens et renards dans les potagers et la fréquence de ces parasites dans leurs fèces.

Partenaires : La thèse se fait sur financement CIFRE, dans le cadre d'une collaboration avec l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses (ELIZ) et l'ANSES-Nancy.

Résultats : Plusieurs terrains maraîchers se sont avérés positifs pour la détection de *T. gondii* et la caractérisation de ces potagers a été faite pour évaluer le risque lié à ce parasite. L'information des maraîchers et particuliers sur le risque de contamination lié à la fréquentation des potagers par les carnivores et sur les mesures de prévention à mettre en place s'avère particulièrement indiquée pour les populations concernées par la pratique du maraîchage. (Trois articles en cours de publication)

## **2- Pathogénicité de *Toxoplasma gondii***

### 2-1 Screening et identification de molécules naturelles actives sur *Toxoplasma gondii* et autres protozoaires d'intérêt médical

Objectif : développer une unité locale de criblage moléculaire permettant d'évaluer *in vitro* la chimiosensibilité de protozoaires largement répandus (*Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Neospora caninum*) à des substances naturelles issues d'arbres.

Partenaires : Ce projet est réalisé sous la co-direction du Pr. Jean-Hugues RENAULT (Institut de Chimie Moléculaire de Reims, Isolement et Structure – UMR CNRS 7312) et du Dr. Dominique AUBERT (Laboratoire de Parasitologie, UFR Médecine – EA 3800, CNR de la Toxoplasmosse).

#### Résultats :

Un criblage de 8 composés isolés à partir de l'écorce de *Anogeissus leiocarpus*, ou boulot africain, a été réalisé sur *T. gondii*. Les composés 1, 2, 6 et 8 se sont montrés efficaces contre le parasite, avec des  $CI_{50}$  respectives de 59,30  $\mu\text{g/mL}$ , 12,83  $\mu\text{g/mL}$ , 26,63  $\mu\text{g/mL}$  et 13,78  $\mu\text{g/mL}$ . De même, pour *N. caninum*, les composés 2 et 6 ont montré une action antiparasitaire, avec des  $CI_{50}$  respectives de 11,96  $\mu\text{g/mL}$  et 44,21  $\mu\text{g/mL}$ . Ces résultats ont fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet auprès de la SATT Nord.

Un test d'invasion a ensuite été réalisé sur *T. gondii*, suite à la demande de la SATT Nord concernant notre dépôt de brevet pour obtenir des résultats *in vitro*. Ce test a pour but d'identifier à quel moment du cycle parasitaire les composés antiparasitaires 2 et 6 (les plus actifs) ont un impact. Les résultats montrent une inhibition de l'invasion parasitaire de 25% par le composé 2 et de 50% par le composé 6. De plus, à l'examen microscopique (qui confirme ces résultats), les parasites semblent accrochés à la surface des cellules (les parasites extracellulaires n'étant pas accrochés aux cellules ont été éliminés lors du lavage).

Enfin, la chimiosensibilité de *T. gondii* et de *N. caninum* vis-à-vis de 30 extraits d'écorces d'arbres provenant des Ardennes (à raison de 3 extraits différents pour chacun des arbres suivants : hêtre commun, chêne pédonculé, aulne glutineux, merisier, érable sycomore, frêne commun, peuplier robusta, mélèze d'Europe, épicéa commun, tremble d'Europe) a été évaluée. Pour *T. gondii*, les extraits n°1 d'aulne et de mélèze ont montré une activité antiparasitaire (leur  $CI_{50}$  respective étant de 24,07  $\mu\text{g/mL}$  et 66,67  $\mu\text{g/mL}$ ). Pour *N. caninum*, seul l'extrait n°1 d'aulne était actif. Sa  $CI_{50}$  reste à déterminer.

#### Perspectives :

Afin de compléter les résultats de la chimiosensibilité *in vitro* de *T. gondii* vis-à-vis de *Anogeissus leiocarpus*, une étude *in vivo* sera mise en place afin d'évaluer l'efficacité des composés 2 et 6 sur des modèles de souris infectées par *T. gondii* et *N. caninum*.

L'extrait d'aulne n°1 sera fractionné par Extraction de Partage Centrifuge afin d'identifier la fraction la plus active. Le(s) composé(s) pur(s) responsable(s) de cette activité antiparasitaire mise en évidence sur *T. gondii* et, le cas échéant, sur *N. caninum*, sera (seront) isolé(s) et identifié(s).

Cette approche méthodologique permettra, à terme, de mettre au point un outil de criblage de composés à potentiel antiparasitaire.

## 2-2 Identification de marqueurs génomiques de résistance par NGS

Partenaires : D.Aubert et I.Villena (Pôle Souches et Pôle Épidémiologie) en collaboration avec le laboratoire de Cochin (F Arieu et H Yéra) réalisent le séquençage de plusieurs souches afin d'identifier des marqueurs de résistance.

Objectifs : Identifier des marqueurs génomiques de résistance aux anti-toxoplasmiques.

Nous avons donc débuté le séquençage sur différentes souches de *T. gondii* issues de culture de cellules Véro. Tout d'abord, nous avons mis en place un protocole de purification et de validation de la concentration d'ADN de parasites par qPCR, afin de s'affranchir d'échec de séquençage dû à la présence trop importante d'ADN de cellules Vero ou à une concentration trop faible d'ADN de parasites (tableau ci-dessous).

### Résultats :

Les résultats préliminaires ont montré qu'il existe 52 mutations ponctuelles présentes sur l'exome de ME49R<sup>SDZ</sup> comparativement à ME49, entraînant des mutations non synonymes, avec changement d'acide aminé et ceci majoritairement sur des « hypothetical protein » de la base de données (ToxoDB). De plus, il a été mis en évidence un gène amplifié sur la souche ME49R<sup>SDZ</sup> par rapport à la souche sensible ME49.

Souches séquencées	Concentration (ng.µL)	qPCR B-tubuline toxo (ct)	qPCR B-actine (ct)	séquençage	Commentaires
ME49R	34,9ng/µL	ND	ND	SEQUENCAGE	ADN toxo purifié
ME49	80,5ng/µL	20,15	30,6	SEQUENCAGE	ADN toxo purifié
RH	38ng/µL	20,85	33,75	SEQUENCAGE	ADN toxo purifié
MAU	180ng/µL	18,7	27,3	en cours	ADN toxo purifié
ABE	53,5ng/µL	19,8	31,2	en cours	ADN toxo purifié
B1	195ng/µL	18,7	30,3	en cours	ADN toxo purifié

A l'heure actuelle, nous ne savons pas si ce gène amplifié pourrait expliquer la résistance de la souche vis-à-vis de la sulfadiazine. Actuellement trois souches résistantes naturelles sont en cours de séquençage, afin de déterminer la présence de mutations ponctuelles communes avec la souche ME49R<sup>SDZ</sup> ou de gènes amplifiés/délétés qui pourrait expliquer ce phénotype résistant des souches.

Perspectives : Si des marqueurs de résistance sont identifiés, les prélèvements adressés au CNR et qui feraient l'objet d'une demande d'étude de chimiosensibilité pour raison d'échec thérapeutique ou circonstance épidémiologique particulière, pourraient être analysés vis-à-vis de la présence de ces marqueurs par techniques de biologie moléculaire (étude de l'ADN directement extrait des prélèvements sans relance en culture).



## 6.1.b Pôle Souches :

### **1) Séquençage complet du génome de souches de toxoplasme :**

Objectif : Description globale de la diversité du parasite

Partenariat : projet NIH - USA (D. Sibley)

Principaux résultats : le séquençage complet de 62 souches de toxoplasmes (dont 19 provenant du CNR/CRB *Toxoplasma*) confirme l'existence parmi ces souches de 16 haplogroupes. Ces différents haplogroupes présentent à la fois des blocks de gènes conservés, et des gènes codants pour des déterminants de virulence sécrétés par le parasite. Ces résultats contribuent à la connaissance des mécanismes de virulence chez la souris des différents haplogroupes de toxoplasmes (Lorenzi et al. Nature Communications, 2016, 7, 10147).

**2) PHRC interrégional TOXODFA : Toxoplasmose cérébrale et SIDA** dans les départements français d'Amérique. Apport diagnostique de la PCR et diversité génétique du *Toxoplasma*.

Objectif principal : Evaluer la performance diagnostique de la PCR *Toxoplasma* en temps réel à partir du sang dans la toxoplasmose cérébrale chez les patients atteints de SIDA dans les DFA.

Partenariats : Porteur du projet : D. Ajzenberg , UMR INSERM 1094 Limoges, CNR/CRB Toxoplasmose

- Centre Hospitalier Universitaire de Pointe à Pitre, Guadeloupe  
Maladies Infectieuses : Lamaury Isabelle

Laboratoire de Microbiologie : Nicolas Muriel

- Centre Hospitalier Universitaire de Fort-de-France, Martinique

Maladies Infectieuses et Tropicales : Cabié André

Laboratoire de microbiologie : Desbois-Nogard Nicole :

- Centre Hospitalier Andrée Rosemon de Cayenne, Guyane française

Maladies Infectieuses et Tropicales : Djossou Félix

Couppie Pierre Centre d'Information et de Soins de l'Immunodeficiency Humaine :  
Nacher Mathieu

Laboratoire de Parasitologie / Mycologie : Demar Magalie

- Centre Hospitalier de l'Ouest guyanais, Guyane française

Médecine : Vautrin Cyrille

Laboratoire de Biologie Médicale : Boukhari Rachida

Principaux résultats : La sensibilité de la PCR dans les liquide céphalo-rachidien chez 44 patients sidéens de Guyane et des Caraïbes n'est que de 25% ; Cette faible sensibilité est similaire à celle retrouvée chez les patients en Europe, malgré les différences observées dans les souches circulant dans ces 2 zones géographiques. (Ajzenberg et al. PNTD. 2016).

### **3) Génotypes et toxoplasmoses congénitales à 5 ans**

Objectif : analyser les liens entre génotypes multilocus et évolution des toxoplasmoses congénitales à 5 ans.

Partenariats : tous les membres du réseau du CNR contribuant à l'envoi de données cliniques et de souches

Financement : région Limousin (financement d'un post-doctorant, Rym El-Abed)

Etat d'avancement : article en cours de rédaction

### **4) Introgression des génotypes de *Toxoplasma gondii* entre la France et l'Afrique de l'Ouest**

Objectif : étudier l'influence humaine (transport, importation) et environnementale (migration d'oiseaux) sur la structuration des populations de toxoplasme et leurs virulences

Partenariat : UMR INSERM 1094

Apport du CNR : génotypes des souches et ADN de toxoplasmes provenant de patients infectés en Afrique

Etat d'avancement : thèse en cours (L. Galal).

### 6.1.c Pôle Sérologie :

L'unité de recherche intitulée « dynamique des interactions hôtes pathogènes » (DHPI) est localisée à l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale (IPPTS), siège jusqu'en 2016 du pôle Sérologie du CNR. *Toxoplasma gondii* persiste dans des organes réservoir comme les muscles, le système nerveux central et les tissus rétinien. La latence de *Toxoplasma* n'est permise que parce que le parasite exploite la cellule-hôte à son avantage et interfère avec de nombreuses voies de signalisation de la cellule-hôte, dont la régulation des cytokines inflammatoires. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les parasites interfèrent avec la cellule-hôte demeurent inconnus. L'équipe de recherche du laboratoire est particulièrement intéressée par l'étude des mécanismes de latence et de persistance de *Toxoplasma gondii* dans l'oeil et ses implications physiopathologiques et thérapeutiques. La toxoplasmose oculaire (TO) est une cause majeure de cécité dans le monde [1]. Cette persistance peut ne pas être toujours détectée, mais mène dans certains cas à la destruction des tissus. En effet, la toxoplasmose d'origine congénitale ou acquise est la principale cause d'uvéite postérieure (Rapport CNR Toxoplasmose \_ Année Exercice 2014 \_Page 48 sur 64). En France, le nombre de cas est estimé à 800.000, mais, bien que la plupart de ces infections soient dormantes, elles n'en demeurent pas moins susceptibles de se réactiver avec des conséquences dramatiques comme une perte de la vision due à une nécrose de la rétine [2]. Malgré cette importance médicale considérable, la physiopathologie de cette affection reste largement inexplorée et il n'y a pas de consensus pour le traitement de la TO. L'utilisation d'antibiotiques et d'anti-inflammatoires ne permettant pas l'élimination du parasite ou d'empêcher sa réactivation [3], il y a un besoin urgent de découvrir de nouvelles approches thérapeutiques. A cette fin, nous avons besoin d'une vision plus détaillée du processus physiopathologique. Nous avons déterminé précédemment la présence chez l'homme de l'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire et son rôle délétère de l'IL-17 dans un modèle animal [4]. En 2013, l'équipe s'est focalisée sur ce projet portant sur la régulation de la réponse inflammatoire (Th17) et sa régulation, notamment par l'IL23. Nous avons développé un modèle murin d'infection aiguë, ainsi qu'un modèle de réactivation qui vont nous servir à décrypter la réponse immunitaire intraoculaire dans ces deux manifestations cliniques [5]. Enfin, nous avons aussi étudié et comparé la réponse immunitaire oculaire de patients atteints de TO de patients en Europe et en Amérique du Sud. Nous avons déterminé que les souches plus virulentes de *T. gondii* induisaient une pathologie plus sévère liée à la diminution de l'IFN-gamma protectrice [6]. Par ailleurs nous avons établi en 2014 un nouveau modèle murin mimant les récurrences oculaires d'origine toxoplasmique et indiquant clairement le rôle délétère de l'IL-6 dans la destruction de la rétine, ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques [7].

1. Pfaff AW, de-la-Torre A, Rochet E, Brunet J, Sabou M, Sauer A, Bourcier T, Gomez-Marin JE, Candolfi E: New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *Int J Parasitol*, 44(2):99-107.
2. Subilia-Guignier A, Villard O, Filisetti D, Escande B, Candolfi E, Speeg-Schatz C, Sauer A: [Role of systematic ophthalmological screening for congenital toxoplasmosis: Epidemiological study of an Alsatian cohort from 1990 to 2011.]. *J Fr Ophtalmol*.
3. Sauer A, Villard O, Bourcier T, Speeg-Schatz C, Candolfi E: [Ocular toxoplasmosis: from pathophysiology to microbiological diagnosis]. *J Fr Ophtalmol*, 36(1):76-81.
4. Sauer A, Pfaff AW, Villard O, Creuzot-Garcher C, Dalle F, Chiquet C, Pelloux H, Speeg-Schatz C, Gaucher D, Prevost G et al: Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J Infect Dis*, 206(8):1319-1329.
5. Sauer A, Rochet E, Lahmar I, Brunet J, Sabou M, Bourcier T, Candolfi E, Pfaff AW: The local immune response to intraocular *Toxoplasma* re-challenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int J Parasitol*, 43(9):721-728.
6. De-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, Ballonzoli L, Villard O, Ajzenberg D, Sundar N et al: Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased *Iln-gamma/Il-17a* and increased *Il-6/Il-13* intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(11):e2541.
7. Rochet É, Brunet J, Sabou M, Marcellin L, Bourcier T, Candolfi E, Pfaff AW. IL-6 driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. *Infect Immun*. 2015 Mar 9. pii: IAI.02985-14. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25754200.

#### 6.1.d Pôle Biologie Moléculaire :

##### **Etude rétrospective portant sur les pratiques et sur les performances des méthodes de PCR utilisées dans le réseau**

Les réponses aux questionnaires techniques des 30 laboratoires participants au CQ national entre 2008 et 2015 ont été analysées et résumées, grâce notamment à l'apport de Guillaume ROUX, A.H.U. en Parasitologie. Cette analyse des pratiques fait suite à celle publiée sur la période précédente de 2002 à 2008 (Sterkers et al., Clin. Microb. Infect. 2010). Les observations les plus notables sont l'abandon de la PCR conventionnelle pour ce diagnostic, de l'utilisation d'une seconde méthode de confirmation, et de la cible B1 au profit de la cible rep529. Toutefois, une grande diversité des pratiques et des méthodes est maintenue, du fait notamment de l'utilisation de plus en plus fréquente d'automates d'extraction (cinq automates différents sont utilisés et remplacent la méthode d'extraction Qiagen manuelle), et l'utilisation croissante de trousse commerciales. Deux trousse commerciales sont maintenant utilisées par un quart des laboratoires. Ainsi, l'extraction la plus utilisée reste l'extraction manuelle Qiagen®, la méthode de PCR la plus utilisée est celle décrite par Reischl et al (BMC Infect Dis 2003) et la seconde est la trousse commerciale Bioevolution®. Dans ces enquêtes, des questions concernent également les aspects techniques pouvant avoir un impact sur la sensibilité et la spécificité : témoin négatif, témoin d'extraction, témoin positif, analyse en multiplicata,... Le Pôle Biologie moléculaire du CNR a défini un "score de bonnes pratiques" à partir de ces critères. L'analyse de l'évolution de ce score montre qu'il s'améliore au fur et à mesure sur la cohorte et qu'il est prédictif de l'absence de faux négatif et de faux positif aux différentes sessions du CQ national.

L'analyse des performances des différentes méthodes a également été étudiée. Cette étude inclut les résultats de 1328 liquides amniotiques et 1032 échantillons de plasma, parmi lesquels nous distinguons 849 échantillons pour lesquels la charge parasitaire était <10 toxoplasmes/mL. La sensibilité globale est de 94,9%; elle baisse à 93,7% si on inclut les liquides amniotiques avec une charge parasitaire < 10 toxoplasmes /mL. Durant la période d'étude, la sensibilité est passée de 82,8% en 2010 à 97% en 2016. La spécificité globale en 2016 était proche de 98%; et sur la même période elle reste excellente, à 98.2%, ce qui correspond à cinq résultats rendus faussement positif par quatre laboratoires, sur les 608 échantillons négatifs adressés durant la période.

Bien que le CQ national soit purement qualitatif, le CNR analyse aussi les résultats quantitatifs donnés par les participants. L'utilisation de la PCR en temps réel donne la possibilité de quantifier les charges parasitaires, ce qui, selon des études précédentes (Costa et al., Prenat. Diag. 2001; Romand et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 2004), devrait permettre de prédire le pronostic. Les données dans la littérature concernant la corrélation entre charge parasitaire dans le liquide amniotique et gravité de la toxoplasmose congénitale sont rares et ne convainquent pas complètement la communauté. Une corrélation entre charge parasitaire et pronostic de la "toxoplasmose-maladie" chez l'immunodéprimé est également une question d'importance croissante et non résolue. Nous avons donc étudié ici l'exactitude de la quantification des laboratoires participants au CQ national. On observe une grande dispersion des quantifications dans cette étude, et aucun des 25 laboratoires n'a quantifié tous les échantillons dans un intervalle de facteur 2. On remarque également d'importantes variations de la justesse au cours des ans, pas toujours vers l'amélioration. Enfin, la répétabilité majoritairement satisfaisante cache de grandes disparités inter et intra-laboratoire. Ainsi l'exactitude de la quantification par la PCR-Toxoplasma dans le liquide amniotique ne permet pas de rendre un résultat quantitatif avec une approximation inférieure à un facteur 10, ce qui conforte le Pôle "Biologie Moléculaire" du CNR dans sa recommandation de ne pas rendre de résultat quantitatif en pratique de routine.

La présentation de cette dernière analyse a été acceptée en communication affichée au congrès 2017 de la Société Française de Parasitologie. Deux manuscrits concernant l'analyse des résultats des performances et des pratiques des laboratoires participants au CQ national entre 2008 et 2015 sont en cours de rédaction et devraient être prochainement soumis dans J. Clin. Microbiol.

## 6.2 Publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

### (i) Publications nationales

CHIQUET C., APTEL F., COMBEY DE LAMBERT A., BRON AM., CAMPOLMI N., PALOMBI K., THURET G., ROUBEROL F., CORNUT PL. & CREUZOT-GARCHER C. For The French Institutional Endophthalmitis Study Group. (Grenoble). Occurrence and risk factors for retinal detachment after pars plana vitrectomy in acute postcataract bacterial endophthalmitis. *Br. J. Ophthalmol.* 2016, 100, 1388-92.

### (ii) Publications internationales

#### 2017

ARMENGOL C., CASSAING S., ROQUES-MALECAZE C., CHAUVIN P., IRIART X., BERRY A., et al. Time before anti-Toxoplasma IgG seroconversion detection by seven commercial assays in French pregnant women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2017, 87, 103-7.

CHEMLA C., VILLENA I., for the Reims Toxoplasmosis Group. Sulfadoxine-Pyrimethamine combination in Congenital Toxoplasmosis, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2017, 36, 349-350.

DARD C., CHEMLA C., FRICKER-HIDALGO H., BRENIER-PINCHART MP., BARET M., MZABI A., VILLENA I., PELLOUX H. Late diagnosis of congenital toxoplasmosis bases on serological follow-up : A case report. *Parasitol. Int.*, 2017, 66, 186-9.

LIMON G., BEAUVAIS W., DADIOS N., VILLENA I., COCKLE C., BLAGA R., GUITIAN J. Cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* infection in pig farms in England. *Foodborne Pathogens and Disease. Foodborne Pathog. Dis.*, 2017, doi: 10.1089/fpd.2016.2197. [Epub ahead of print].

PEYRON F., MC LEOD R., AJZENBERG D., CONTOPOULOS-IOANNIDIS D., KIEFFER F., MANDELBROT L., SIBLEY LD., PELLOUX H., VILLENA I., WALLON M., MONTOYA JG. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLoS Negl; Trop. Dis.*, 2017, 11(2):e0005222.

POMARES C., HOLMES TH., ESTRAN R., PRESS CJ., RAMIREZ R., TALUCOD J., MAECKER H., ROSENBERG-HASSON Y., MONTOYA JG. Cytokine profiles in patients with toxoplasmic lymphadenitis in the setting of pregnancy. *Cytokine*, 2017, 90, 14-20.

SIMON JA., KURDZIELEWICZ S., JEANNIOT E., DUPUIS E., MARNEF F., AUBERT D., VILLENA I., POULLE ML. Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. *Int. J. Parasitol.*, 2017, pii: S0020-7519(17)30079-6.

#### 2016

AJZENBERG D., LAMAURY I., DEMAR M., VAUTRIN C., CABIE A., SIMON S., NICOLAS M., DESBOIS-NOGARD N., BOUKHARI R., RIAHI H., DARDE ML., MASSIP P., DUPON M., PREUX PM., LABRUNIE A., BONCOEUR MP. Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* : A Prospective and Multicentric Study. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 2016, 10(6):e0004790.

BAMBA S., HALOS L., TARNAGDA Z., ALANIO A., MACÉ P., MOUKOURY S., SANGARÉ I., GUIGUEMDÉ R., COSTA JM., BRETAGNE S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol.*, 2016, 230,10-5.

BIGOT A., PALOS LADEIRO M., LEPOUTRE A., BASTIEN F., BONNARD I., DUBEY JP., VILLENA I., AUBERT D., GEFFARD O., FRANCOIS A., GEFFARD A. Bioaccumulation of *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* by the crustacean *Gammarus fossarum*: involvement in biomonitoring survey and trophic transfer. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2016, 133, 188-94.

- BOURGUET E., BRAZHNİK K., SUKHANOVA A., MOROY G., BRASSART-PASCO S., MARTIN AP., VILLENA I., BELLON G., SAPI J., NABIEV I. Design, Synthesis, and Use of MMP-2 Inhibitor-Conjugated Quantum Dots in Functional Biochemical Assays. *Bioconjug Chem.*, 2016, 27, 1067-81.
- CONG W., MENG QF., BLAGA R., VILLENA I., ZHU XQ., QIAN AD. *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV) infections in stray and pet cats (*Felis catus*) in northwest China: co-infections and risk factors. *Parasitol. Res.*, 2016, 115, 217-23.
- DARD C., FRICKER-HIDALGO H., BRENIER-PINCHART M.P., PELLOUX H. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends Parasitol.*, 2016, 32 : 492-506.
- DESOUBEUX G., CABANNE É., FRANCK-MARTEL C., GOMBERT M., GYAN E., LISSANDRE S., RENAUD M., MONJANEL H., DARTIGEAS C., BAILLY É., VAN LANGENDONCK N., CHANDENIER J. Pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients with interstitial pneumonia: a single-centre prospective study assessing PCR-based diagnosis. *J. Clin. Pathol.*, 2016, 69, 726-30.
- DJOKIC V., BLAGA R., AUBERT D., DURAND B., PERRET C., GEERS R., DUCRY T., VALLEE I., DJURKOVIC DJAKOVIC O., MZABI A., VILLENA I., BOIREAU P. *Toxoplasma gondii* infection in pork produced in France. *Parasitology*, 2016, 143, 557-67.
- DUBEY JP., VERMA SK., VILLENA I., AUBERT D., GEERS R., SU C., LEE E., FORDE MS., KRECEK RC. Toxoplasmosis in Caribbean islands: Literature review, seroprevalence in pregnant women in ten countries, isolation of viable *Toxoplasma gondii* from dogs from St. Kitts, West Indies with report of new *T. gondii* genetic types", *Parasitol. Res.*, 2016, 115, 1627-34.
- FRICKER-HIDALGO H., L'OLLIVIER C., BOSSON C., IMBERT S., BAILLY S., DARD C., PIARROUX R., PARIS L., PELLOUX H. Interpretation of the Elecsys Toxo IgG avidity results for very low and very high index: study on 741 sera with a determined date of toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016 Dec 19. (Epub ahead of print).
- GAY G. (co-First), BRAUN L. (co-First), BRENIER-PINCHART M.P., VOLLAIRE J., JOSSERAND V., BERTINI RL., VAREANO A., TOUQUET B., DE BOCK P. J., COUTE Y., TARDIEUX I., BOUGDOUR A., HAKIMI MA. *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- $\gamma$ -mediated host defenses. *J. Exp. Med.*, 2016, 213, 1779-98.
- HOHWYER J., CAZEAUX C., TRAVAILLÉ E., LANGUET E., DUMÈTRE A., AUBERT D., TERRYN C., DUBEY JP., AZAS N., HOUSSIN M., FAVENNEC L., VILLENA I., LA CARBONA S. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.*, 2016, 57, 36-44.
- KERAMBRUN E., PALOS LADEIRO M., BIGOT-CLIVOT A., DEDOURGE-GEFFARD O., DUPUIS E., VILLENA I., AUBERT D., GEFFARD A. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii* . *J. Applied Microbiol.*, 2016, 120, 498-508.
- LI X., POMARES C., GONFRIER G., KOH B., ZHU S., GONG M., MONTTOYA JG., DAI H. Multiplexed Anti-Toxoplasma IgG, IgM, and IgA Assay on Plasmonic Gold Chips: towards Making Mass Screening Possible with Dye Test Precision. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, 54, 1726-33.
- LORENZI H., KHAN A., BEHNKE MS., NAMASIVAYAM S., SWAPNA LS., HADJITHOMAS M., KARAMYCHEVA S., PINNEY D., BRUNK BP., AJIOKA JW., AJZENBERG D., BOOTHROYD JC., BOYLE JP., DARDE ML., DIAZ-MIRANDA MA., DUBEY JP., FRITZ HM., GENNARI SM., GREGORY BD., KIM K., SAEIJ JP., SU C., WHITE MW., ZHU XQ., HOWE DK., ROSENTHAL BM., GRIGG ME., PARKINSON J., LIU L., KISSINGER JC., ROOS DS., L. SIBLEY D., Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes., *Nat. Commun.*, 2016, 7, 10147.

MACHAČOVÁ T., AJZENBERG D., ŽÁKOVSKÁ A., SEDLÁK K., BÁRTOVÁ E. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild small mammals: Seroprevalence, DNA detection and genotyping. *Vet. Parasitol.*, 2016, 223, 88-90.

MAUHIN W., DEMOULE A., LECLERCQ D., GASNAULT J., PARIS L., KATLAMA C., EPELBOIN L. Toxoplasmic ventriculitis. *Med. Mal. Infect.*, 2016, 46,100-3.

POMARES C., MONTOYA JG. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, 54, 2448-54.

POULLE ML., FORIN-WIART MA., JOSSE-DUPUIS E., VILLENA I., AUBERT D. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by qPCR in feces of cat recently fed infected tissues does not necessarily mean oocyst shedding. *Parasite*. 2016, 23-9.

RIJPKEMA S., HOCHLEY J., RIGSBY P., GUY EC., the Toxoplasma study group (VILLENA I., CHEMLA C.). Establishment of replacement International standart 13/132 for human antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Biologicals*, 2016, 44, 448-55.

ROBERT-GANGNEUX F., BELAZ S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2016, 29, 330-9.

RUDZINSKI M., KHOURY M., COUTO C., AJZENBERG D. Reactivation of Ocular Toxoplasmosis in Non-Hispanic Persons, Misiones Province, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, 22, 912-3.

SMETS A., FAUCHIER T., MICHEL G., MARTY P., POMARES C. Comparison of *Toxoplasma gondii* IgG avidity Architect and Vidas assays with the estimated date of infection in pregnant women. *Parasite*. 2016, 23-45.

TRAVAILLE E., LA CARBONA S., GARGALA G., AUBERT D., DUMETRE A., GUYOT K., VILLENA I. HOUSSIN M. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Food Control.*, 2016, 59, 359-65.

VILLARD O., CIMON B., L'OLLIVIER C., FRICKER-HIDALGO H., GODINEAU N., HOUZE S., PARIS L., PELLOUX H., VILLENA I., CANDOLFI E. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection : Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, 84, 22-33.

VILLARD O., CIMON B., L'OLLIVIER C., FRICKER-HIDALGO H., GODINEAU N., HOUZE S., PARIS L., PELLOUX H., VILLENA I., CANDOLFI E. Help in the Choice of Automated or Semiautomated Immunoassays for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis: Evaluation of Nine Immunoassays by the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, 54, 3034-42.

### **Chapitre de livres**

ANOFEL, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales, chapitre toxoplasmose. Ed Elsevier, 2016.

### **Nouveaux centres à compter de 2017**

CHAPUIS A., CHABROT C., MIRAND A., POIRIER P., NOURRISSON C. Encephalitis caused by an unusual human herpes virus type 6 and *Toxoplasma gondii* co-infection in a cord blood transplant recipient. *Int. J. Infect. Dis.*, 2016, 46, 79-81.

CONRAD A., et al. and the HEMINF study Group (Wallon M.). A matched case-control study of toxoplasmosis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: still a devastating complication. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, 22, 636-41.

LEVIGNE P., PEYRON F., WALLON M. Assessment of the diagnostic performance of the IDS-iSYS tests for toxo IgG, toxo IgM and avidity. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, 86,148-52.

WALLON M., PEYRON F. Effect of Antenatal treatment on the Severity of Congenital Toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, 62, 811-2.

### **(iii) Communications nationales**

**2016**

ARMENGOL C., CASSAING S., ROQUES-MALECAZE C., CHAUVIN P., IRIART X., BERRY A., FILLAUX J. Délais de détection des IgG anti-Toxoplasma, par sept réactifs commercialisés, au cours de séroconversion chez la femme enceinte, JIB, Paris, 22-24 juin 2016.

BRANCHU A., LEDIEN J., MURAT JB., DARDE ML., VIGNOLES P. Étude de la variation du taux de séroconversions toxoplasmiques chez les femmes enceintes en Limousin entre 1999 et 2014. Journée de Recherche Tours-Poitiers-Limoges, Limoges, 15 janvier 2016. (communication affichée).

DARD C., BAILLY S., BRENIER-PINCHART MP., FRICKER-HIDALGO H., CLÉRY-BARRAUD C., TAMISIER R., PÉPIN JL., PELLOUX H. Toxoplasmose chronique et apnée du sommeil : sont-elles liées ? Journée de la Recherche Médicale, Faculté de Médecine de Grenoble, 10 Juin 2016. (communication affichée).

GALAL L., VIGNOLES P., AJZENBERG D., MURAT JB., DARDÉ ML., MERCIER A. Étude de la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* en Afrique de l'Ouest et recherche des déterminants de son évolution : bilan de mission d'échantillonnage au Sénégal (2016) et premiers résultats ; Club Toxo – 8ème édition – Paris, Institut Cochin, 15 Novembre 2016.

MURAT JB., AUBERT D., FOURDRINIER F., PASSEBOSC K., RIAHI H., ORTIS N., VILLENA I., DARDE ML. Titre : Présentation du Centre de Ressources Biologiques (CRB) *Toxoplasma* : un outil au service de la recherche. Club Toxo – 8ème édition – Paris, Institut Cochin, 15 Novembre 2016.

ROUSSEAU A., AUBERT D., FAVENNEC L., LA CARBONA S., VILLENA I. Impact de différents traitements physiques sur l'intégrité membranaire des oocystes de *Toxoplasma gondii* : Utilisation du monoazoture de propidium (PMA). Journée des Jeunes Chercheurs, Amiens, 18 mars 2016. (communication affichée).

### **(iv) Communications internationales**

**2016**

BALEA A., DE CRAEYE S., GYÖRKE A., SPANO F., NICASTRO C., SCHARES G., GHERMAN CM., SÁNDOR AD., MIHALCA AD., TĂBĂRAN F., POP L., VILLENA I., COZMA V. Serologic and molecular survey on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild raptors in Romania. EMOP, the 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku, Finland, July 20-24th 2016. (communication affichée).

BASTIEN M., COMBES B., UMHANG G., GOULEY V., GUISLAIN M., QUINTAINE T., FORIN-WIART M., GEERS R., VILLENA I., BOUÉ F., POULLE ML. Les terrains maraichers, lieux à risque de contamination par *Echinococcus multilocularis* et *Toxoplasma gondii* ? Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016.

BASTIEN M., UMHANG G., COMBES B., VANISCOTTE A., RATON V., GERMAIN E., VILLENA I., AUBERT D., BOUE F., POULLE ML. Risk factors for kitchen gardens contamination by *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii* and *Toxocara spp.* in northeastern France. EMOP, the 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku, Finland, July 20-24th 2016.

BIGOT-CLIVOT A., PALOS LADEIRO M., LEPOUTRE A., BASTIEN F., BONNARD I., DUBEY JP., VILLENA I., AUBERT D., GEFFARD O., FRANÇOIS A., GEFFARD A., Use of the crustacean *Gammarus fossarum* in biomonitoring survey and trophic transfer of protozoa *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum*. Congrès SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), Nantes, 22-26 Mai 2016. (communication affichée).

BOLAIS PF., VIGNOLES P., PEREIRA PF., KEIM R., AMENDOEIRA MR., DARDE ML. *Toxoplasma gondii* in cats of Rio de Janeiro: an eco-epidemiological survey with the use of filter-papers. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. (communication affichée).

BRANCHU A., LEDIEN J., MURAT JB., DARDE ML., VIGNOLES P. Variation du taux de séroconversions toxoplasmiques chez les femmes enceintes en Limousin : étude rétrospective entre 1999 et 2014. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. (communication affichée).

CANNELLA D., BRENIER-PINCHART MP., BERTINI RL., PELLOUX H., HAKIMI MA. Deciphering the microRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain using a murine model of chronic Toxoplasmosis. 2nd biannual ParaFrap conference "From basic research to intervention strategies against parasites", Les Embiez Island, 2-5 Octobre 2016. (communication affichée).

DARD C., BAILLY S., BRENIER-PINCHART MP., FRICKER-HIDALGO H., CLERY-BARRAUD C., TAMISIER R., PEPIN J.L., PELLOUX H. Toxoplasmose chronique et apnée du sommeil : sont-elles liées? Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. (communication affichée).

DARD C., BAILLY S., DROUET T., BRENIER-PINCHART M.P., FRICKER-HIDALGO H., PELLOUX H. La congélation longue durée des sérums n'affecte pas la stabilité des anticorps anti-Toxoplasma. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. (communication affichée).

DARD C., BRENIER-PINCHART MP., BERTINI RL., SINDIKUBWABO F., PELLOUX H., HAKIMI MA. A bradyzoite-species and PVM-associated protein plays a role in the structural integrity of brain cysts purified from mice chronically infected by *T. gondii*. 2nd biannual ParaFrap conference "From basic research to intervention strategies against parasites", Les Embiez Island, France, 2-5 Octobre 2016. (communication affichée).

GALAL L., MURAT JB., VIGNOLES P., AJZENBERG D., DARDÉ ML., BROUAT C., GRANJON L., MBACKÉ S., MERCIER A. Phénomènes d'introgessions dans l'étude de la diversité génétique du toxoplasme entre la France et l'Afrique de l'ouest : des influences humaines et environnementales à explorer. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016.

GAY G. (Co-First), BRAUN L. (Co-First), BRENIER-PINCHART MP., VOLLAIRE J., JOSSERAND V., BERTINI RL., VARESSANO A., TOUQUET B., DE BOCK P. J., COUTE Y., TARDIEUX I., BOUGDOUR A., HAKIMI MA. Toxoplasma TgIST co-opts host chromatin repressors dampening the STAT1-dependent pathway of innate immunity mediated by IFN- $\gamma$ . 2nd biannual ParaFrap conference "From basic research to intervention strategies against parasites", Les Embiez Island, 2-5 octobre 2016.

LA CARBONA S., HOHWYER J., CAZEAUX C., TRAVAILLÉ E., DUMÈTRE A., AUBERT D., HOUSSIN M., FAVENNEC L., VILLENA I. Method to simultaneously detect the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves during refrigerated storage. EMOP, the 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku, Finland, July 20-24th 2016. (communication affichée).

LESOIN A., CHUMPITAZI B., BOUILLET L., FRICKER-HIDALGO H., CAMPOLMI N., FLORI P., VASSENEIX C., LACHARME T., BRENIER-PINCHART M.P., CHIQUET C., PELLOUX H. Evaluation des anticorps sériques type immunoglobulines G (IgG) anti-heat shock protein 70 (Hsp70) dans le diagnostic de rétinohoroïdite toxoplasmique. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. (communication affichée).

MAMMARI N., VIGNOLES P., COURTILOUX B., DARDE ML. Etude de l'expression des médiateurs immuns dans des cellules nerveuses humaines infectées par deux souches de *Toxoplasma gondii*. 22th LAAS International Science Conference, Liban, Mai 2016.



MZABI A., ESCOTTE-BINET S., AUBERT D., VILLENA I. Résistance médicamenteuse à la sulfadiazine chez *Toxoplasma gondii* : approche transcriptomique. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016.

PALENCIA A., BOUGDOUR A., BRENIER-PINCHART MP., TOUQUET B., CURT-VARESANO RL., LIU J., LUKARSKA M., GUT J., VOLLAIRE JULIEN, JOSSERAND V., WANG E., ALLEY MRK., LI X., FREUND Y., ROSENTHAL P., CUSACK S., HAKIMI MA. Using benzoxaborole compounds as a new approach to fight human pathogens, including apicomplexan parasites. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et Mycologie, Grenoble, 23 -25 mars 2016.

PALENCIA A. (Co-First), BOUGDOUR A. (Co-First) , BRENIER-PINCHART MP., TOUQUET B., BERTINI RL., VOLLAIRE J., JOSSERAND V., EASOM E., FREUND Y., PELLOUX H., ROSENTHAL P., CUSACK S. , HAKIMI MA. Targeting *Toxoplasma gondii* CPSF-73, a new way to control parasite burden in murine model of toxoplasmosis. 2nd biannual ParaFrap conference "From basic research to intervention strategies against parasites», Les Embiez Island, 2-5 octobre 2016.

ROBERT-GANGNEUX F., BRENIER-PINCHART MP., YERA H., BELAZ S., VARLET-MARIE E., BASTIEN P. Evaluation du coffret Toxoplasma ELITE MGB® pour le diagnostic moléculaire de toxoplasmose. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et Mycologie, Grenoble, 23 -25 mars 2016. (communication affichée)

ROBERT-GANGNEUX F., MERONI V., ACCOCEBERRY I., AGUADO GARCIA JM., AKAN H., BOTTEREL F., CARRATALA J., DRGONA L., DUPONT D., DURKOVIC-DAKOVIC O., FARINAS C., GROLL A., GUY E., JUNIE LM., LEN O., MUNOZ P., PANA ZD., PELLOUX H. Manuel O. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients: a European survey. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, 09-12 avril 2016. (communication affichée).

ROUX G.,VARLET-MARIE E., STERKERS Y., BASTIEN P. Bilan des performances analytiques de la PCR-*Toxoplasma* dans 30 laboratoires français de 2010 à 2015. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. (communication affichée).

ROUX G., VARLET-MARIE E., BASTIEN P., STERKERS Y. Diversité des pratiques et des méthodes de la PCR-*Toxoplasma* en France entre 2008 et 2015 - Bilan des enquêtes du Contrôle Qualité national PCR *Toxoplasma* Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. (communication affichée).

SCHARES G., BANGOURA B., KÖTHE M., LUDEWIG M., RANDAU F., ALNASSAN A.-A., MAKSIMOV P., MATZKEIT B., SENS M., BÄRWALD A., VILLENA I., AUBERT D., CONRATHS FJ., OPSTEEGH M., VAN DER GIESSEN J. Relationship between specific antibodies in chickens and the presence or infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts in meat and other edible tissues. Meeting Euro FBP "Analytical methods for foodborne parasites in human and veterinary diagnostics and in food matrices", Slovénie, 27-28 septembre 2016.

SIMON J., KURDZIELEWICZ S., JEANNIOT E., DUPUIS E., MARNEF F., AUBERT D., VILLENA I., POULLE ML. Influence de la sélection des lieux de défécation par les chats sur la contamination des sols par *Toxoplasma gondii* dans les exploitations laitières. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Grenoble, 23-25 mars 2016. Prix de la meilleure communication orale.

SIMON JA., CHANCEL E., VILLENA I., AUBERT D., HUBERT P., KURDZIELEWICZ S., JEANNIOT E., DUPUIS E., MARNEF F., GILOT-FROMONT E., POULLE ML. Identifying

high-risk spots for *Toxoplasma gondii* infection in dairy farms by combined use of molecular analysis and camera trap monitoring. EMOP, the 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku, Finland, July 20-24th 2016. (communication affichée).

SIMON JA., AUBERT D., GEERS R., POULLE ML., VILLENA I. Accuracy of blotting paper blood samples for serological tests to detect *Toxoplasma gondii* antibodies in semi-feral domestic cat. 12th conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA), Berlin, 27-31 août 2016. (communication affichée).

SIMON JA., PRADEL R., AUBERT D., GEERS R., VILLENA I., POULLE ML. Combined effects of season, age and demographic parameters on toxoplasmosis infection rates and oocysts excretions in semi-feral cat populations. 12th conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA), Berlin, 27-31 août 2016. (communication affichée).

#### **(v) Conférences sur invitations**

MARTY P. La toxoplasmose : aspects clinico-biologiques, prévention et traitement. Congrès Franco-Marocain de Parasitologie : « Les parasites transmis par voie alimentaire », Marrakech (Maroc), 05-07 octobre 2016.

PELLOUX H., FRICKER-HIDALGO H., DARD C., BRENIER-PINCHART M.P. Human congenital toxoplasmosis: focus on recent developments and controversies. *Second Euro-Regional Conference on Parasitic Zoonoses*. Timisoara (Roumanie), 5-9 Octobre 2016.

VILLENA I. La Toxoplasmose : rôle du chat. One Health : Lumière sur quelques zoonoses : 7ème journée d'actualités RESFIZ (Réseau d'Epidémiologie-Surveillance Franco Italien des Zoonoses), Nice, 12 mars 2016.

VILLENA I. Congenital toxoplasmosis: implementation of a surveillance system in France. EMOP, the 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku, Finland, July 20-24th 2016.

VILLENA I. Le risque parasitaire dans les coquillages. Journée pour la Santé, l'Environnement et la Microbiologie, Ifremer, Nantes, 22 septembre 2016.

VILLENA I. Burden of disease (toxoplasmosis). ESCMID Postgraduate Education Course « Infectious Diseases in Pregnant Women, Fetuses and Newborns ». Bertinoro, Italy, September 25- 29 septembre 2016.

VILLENA I. Toxoplasma et environnement. Congrès Franco-Marocain de Parasitologie Marrakech, Maroc, 5-6-7 octobre 2016.

## **7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux**

### **7.1 Coopération avec les laboratoires de santé animale et d'hygiène alimentaire dont les LNR**

Le laboratoire coordonnateur du CNR de la Toxoplasmose (Reims) est associé au LNR (laboratoire national de référence) « Parasites transmis par l'alimentation » de l'ANSES (USC Epitoxo), qui a en charge la surveillance des zoonoses d'origine animale, et à ce titre est en charge de collecter les échantillons d'origine animale et ceux issus de l'alimentation.

Les objectifs de cette coopération sont de développer des méthodes de détection des kystes de *T. gondii* dans les matrices carnées afin de pouvoir contrôler l'état sanitaire des viandes.

Dans ce cadre, le Laboratoire Coordonnateur fournit au LNR des antigènes pour les enquêtes épidémiologiques menées sur les diverses espèces animales, hôtes intermédiaires de *T. gondii*. Il est également amené à collaborer pour le diagnostic de la toxoplasmose chez diverses espèces animales sur demande du LNR ou de LVD.

Ainsi, le laboratoire coordonnateur à travers l'USC Epitoxo<sup>o</sup> et le LNR ont participé ensemble aux plans de surveillance organisés par la DGAL en 2007 (ovins), 2009 (bovins) et 2012 (porcins) sur le territoire national pour évaluer la prévalence de la toxoplasmose dans les élevages français. En 2013, un plan de contrôle sur la viande chevaline importée a été conduit entre l'USC et le LNR.

En 2014-2015, l'USC et le LNR ont participé à une grande étude européenne conduite par l'EFSA en partenariat avec les différentes agences sanitaires européennes, visant à l'évaluation de la contamination par *T. gondii* des viandes européennes (espèces ovines, porcines, bovines, chevalines, volailles) européennes (programme répondant à l'appel d'offre GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01 intitulé « Relationships between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat »). Les Drs D Aubert et I Villena du CNR ont participé activement à ce consortium et l'ensemble des analyses sérologiques (8000 échantillons analysés) ont été effectuées à Reims (tests du MAT avec antigènes fabriqués par le laboratoire). Deux rapports ont été publiés en 2016 et des publications ont été publiées ou sont en cours.

#### **EFSA EXTERNAL SCIENTIFIC REPORTS**

- *Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of Toxoplasma gondii in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01): An extensive literature review.*

Marieke Opsteegh, Miriam Maas, Gereon Schares, and Joke van der Giessen on behalf of the consortium\* : \*Franz Conraths, Berit Bangoura, Radu Blaga, Pascal Boireau, Isabelle Vallee, Vitomir Djokic, Delphine Le Roux, Catherine Perret-Duménil, Tamara Ducry, Henk Wisselink, Jan Cornelissen, Isabelle Villena, Dominique Aubert, Adriana Györke, Vasile Cozma, Viorica Mircean, Anamaria Ioana Paștiu, Anamaria Balea, Zsuzsa Kalmar, Diana Bărburaș, Edoardo Pozio, Furio Spano, Georgina Limon, Milen Georgiev, Damer Blake, Javier Guitian, Javier Dominguez, Frank Katzer, Alison Burrells, Lee Innes, Olgica Djurkovic-Djakovic, Ivana Klun, EFSA supporting publication 2016:EN-996

- *Experimental studies on Toxoplasma gondii in the main livestock species (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01): Final report.*

Marieke Opsteegh, Gereon Schares, Radu Blaga and Joke van der Giessen on behalf of the consortium\* : \*Franz Conraths, Pascal Boireau, Isabelle Vallee, Vitomir Djokic, Delphine Le Roux, Catherine Perret-Duménil, Tamara Ducry, Berit Bangoura, Henk Wisselink, Jan Cornelissen, Isabelle Villena, Dominique Aubert, Adriana Györke, Vasile Cozma, Viorica Mircean, Anamaria Ioana Paștiu, Anamaria Balea, Zsuzsa Kalmar, Diana Bărburaș, Edoardo Pozio, Furio Spano, Georgina Limon, Milen Georgiev, Damer Blake, Javier Guitian, Javier Dominguez, Frank Katzer, Alison Burrells, Lee Innes, Olgica Djurkovic-Djakovic, Ivana Klun, EFSA supporting publication 2016:EN-995

Djokic V., Blaga R., Aubert D., Durand B., Perret C., Geers R., Ducry T., Vallee I., Djurkovic Djakovic O., Mzabi A., Villena I., Boireau P. *Toxoplasma gondii* infection in pork produced in France. *Parasitology*, 2016, 1, 1-11.

Limon G., Beauvais W., Dadios N., Villena I., Cockle C., Blaga R., Guitian J. Cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* infection in pig farms in England. *Foodborne Pathogens and Disease*. In Press.

Dans le cadre de leur coopération, l'USC Epitoxo et le LNR ont collaboré avec l'IFIP (Institut Français du Porc) pour déposer un projet de recherche auprès du Pôle de compétitivité France Agrimer (Appel d'offres 2016) intitulé « Étude du tropisme et de la persistance de *Toxoplasma gondii* : de la carcasse de porc au saucisson sec ».

La viande de porc est un vecteur potentiel, et la possibilité de transfert du parasite chez l'homme via la consommation de produits crus de salaison est incertaine. Ceci s'explique d'une part par une méconnaissance du tropisme musculaire du parasite chez le porc et d'autre part par une absence de données scientifiques robustes permettant d'évaluer l'effet inhibiteur des étapes de fabrication et de conservation de ces produits. Ce programme se propose d'y répondre sur la base de deux axes d'étude consistant à (i) décrypter de manière approfondie l'organotropisme de *T. gondii* au sein de carcasses de porcs naturellement versus expérimentalement infestées (kyste versus oocyste) ; (ii) évaluer l'impact du procédé de fabrication (incluant différents taux d'incorporation en nitrites et en NaCl) et de la conservation du saucisson sec sur la viabilité de *T. gondii*.

Les données recueillies au cours de ce travail permettront de qualifier d'un point de vue qualitatif et quantitatif les matières premières entrant dans la composition du saucisson sec, vis-à-vis du danger *T. gondii*.

Ces essais permettront également de statuer sur le potentiel assainissant du procédé de fabrication et de la conservation du saucisson sec à l'encontre de *T. gondii*, en fonction des niveaux de nitrites et de NaCl employés. Ceci contribuera à une meilleure information, prévention et gestion du risque associé à la consommation de ce type de produits.

Le laboratoire coordonnateur et le LNR se réunissent régulièrement dans le cadre de cette USC pour définir des objectifs de travaux sur l'évaluation du risque lié à la consommation de produits carnés (cf projet cité ci-dessus), des objectifs de développements techniques vis-à-vis d'autres formes de *T.gondii* (oocystes) ou d'échanges technologiques (méthodes de détection des oocystes développées par le Laboratoire Coordonnateur).

Le Pôle Souche du CNR (Limoges) analyse les souches isolées des produits animaux soit dans le cadre d'études spécifiques sur une espèce animale, soit dans le cadre d'une enquête épidémiologique suite à des cas humains groupés (pour mémoire : épidémie de toxoplasmose due à la consommation de viande d'agneau en Aveyron en 2010). .

## **7.2 Coopération avec les laboratoires de l'hygiène alimentaire et l'environnement**

Nous coopérons dans le cadre d'une Unité Mixte Technologique (UMT) « Protorisk » avec le centre technique ACTALIA. L'UMT est un outil de partenariat entre un institut technique et une unité de recherche publique, mis en place et soutenu par le ministère chargé de l'Agro-alimentaire sous la coordination de l'ACTIA, structure nationale qui fédère les activités des Instituts techniques de l'agro-alimentaire (<http://www.actia-asso.eu/>). Nous développons des techniques de détection et d'évaluation de la viabilité des protozoaires (dont *T.gondii*) au sein de matrices complexes (salades, framboises, herbes aromatiques).

Hohweyer J., Cazeaux C., Travaillé E., Languet E., Dumètre A., Aubert D., Terryn C., Dubey Jp., Azas N., Houssin M., Favennec L., Villena I., La Carbona S. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.*, 2016, 57, 36-44.

Travaillé E., La Carbona S., Gargala G., Aubert D., Dumetre A., Guyot K., Villena I. Houssin M. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Food Control*, 2016, 59, 359-65.

- L'étude de la contamination des mollusques bivalves par *Toxoplasma gondii* est également réalisée dans le cadre de projets de coopération avec l'Ifremer.

- Par ailleurs, Le responsable du CNR est membre du CES Microbiologie (devenu CES Biorisk) à l'ANSES et à ce titre participe à l'évaluation des risques parasitaires (et notamment par *T. gondii*) dans les matrices alimentaires ou lors de nouveaux traitements industriels appliquées sur des matrices. Le Dr N. Jourdan da Silva, médecin épidémiologiste à Santé Publique France est également présente à ce CES.

## **8 Programme d'activité pour les années suivantes**

Sont présentées ici les perspectives des travaux à mener au cours du prochain contrat des CNR (2017-2022). Certains travaux sont déjà engagés, d'autres le seront dans les deux années à venir. Certaines activités nécessiteront du temps avant d'être achevées et se dérouleront au cours de l'ensemble de la mandature.

### **8.1 Perspectives du Pôle Epidémiologie**

**1- La surveillance de la toxoplasmose congénitale en France se poursuivra en 2017 avec le même système de recueil des cas diagnostiqués** et notifiés par le réseau de laboratoires Toxosurv. L'analyse des résultats de la déclaration des cas notifiés en 2016 sera toujours conduite par le Laboratoire Coordonnateur (I. Villena) en collaboration avec l'ARC (C Delmas).

Avec le recul des données du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales acquises depuis 2007 ; le Laboratoire Coordonnateur aidé par les Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie évaluera les pratiques du diagnostic biologique de cette affection (valeur des différentes techniques proposées dans le diagnostic anténatal et postnatal de la toxoplasmose 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). Ces travaux seront faits en lien avec les Pôles Biologie moléculaire et Sérologie. 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 (réunion annuelle du CNR) puis avec Santé Publique France (et le Comité de Pilotage « Toxosurv » lors de la réunion de validation).

- Une publication sur les résultats de cette surveillance menée depuis 2007 sera faite avec le bilan des 10 années de surveillance. Pour cela, il s'avèrera nécessaire en 2018 de refaire une extraction des données de la totalité de la base dans le logiciel Toxosurv, car des cas ont pu être ajoutés par la suite des analyses et rapports annuels, des informations ont également pu être ajoutées sur les cas. Il s'agit donc d'un très gros travail d'analyses et de synthèse à faire sur l'ensemble des cas. Nous prévoyons une publication dans le journal Eurosurveillance.

**2- En 2017, le Laboratoire Coordonnateur conduira une enquête** 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). Le Laboratoire Coordonnateur souhaiterait mener une enquête auprès des LABM afin d'identifier de nouveaux laboratoires susceptibles d'être intégrés au réseau Toxosurv. Ces enquêtes seront faites afin d'évaluer l'exhaustivité du recueil, elles paraissent nécessaires vue i) la restructuration de la Biologie Médicale avec regroupement de nombreux laboratoires privés ou de laboratoires au sein d'établissements publics de petite taille (CH), ii) la diminution du nombre de cas constatée par rapport aux premières années de la mise en place de la surveillance iii) la date de l'enquête qui avait conduit à la composition du réseau (année 2006, soit 10 ans actuellement). Ce souhait du Laboratoire coordonnateur date de plusieurs années, cependant il s'avère difficile de réaliser une enquête isolée « Toxoplasmose » auprès des LABM et une réflexion doit être conduite avec Santé Publique France sur la façon de réaliser cette enquête.

### **3- Positionnement sur la littérature relative à l'association « troubles psychiatriques et toxoplasmose »**

Le CNR de la Toxoplasmose est sollicité par l'InVS pour évaluer la littérature relative à l'association potentielle entre la toxoplasmose et les troubles neuro-psychiatriques, cette littérature est abondante mais sa qualité est hétérogène. Par ailleurs, l'étude des capacités de manipulation des parasites sur le comportement cellulaire et sur celui d'hôtes

intermédiaires (rongeurs) est déjà largement démontrée dans de nombreux articles scientifiques.

Ce travail d'analyse critique de la littérature associe des parasitologues (membres du CNR-Toxoplasmose), neurologues, psychiatres et des méthodologistes (Pr C Binquet, Dijon). Les membres du CNR participant à ce travail sont :

Pr E Candolfi, CHU Strasbourg, Pr ML Dardé, CHU Limoges, Dr L Delhaes, CHU Bordeaux  
Pr F Robert-Gangneux, CHU Rennes, Pr P Marty, CHU Nice, Pr H. Pelloux, CHU Grenoble,  
Pr I Villena, CHU Reims et Pr M Wallon, CHU Lyon.

Les parasitologues et C. Binquet ont sélectionné les articles publiés entre 1994 et décembre 2015 en fonction de la qualité des critères sérologiques des études. Après un scoring des articles sur la méthodologie (analyse de la valeur des techniques sérologiques utilisées pour la catégorisation des patients et analyse de la valeur des statistiques données dans les publications), nous demanderons aux cliniciens d'évaluer le versant neuro-psychiatrique de ces articles, l'évaluation méthodologique des publications est en cours de réalisation par l'équipe d'épidémiologie du CHU de Dijon (Pr C Binquet).

Les articles sont regroupés en trois grandes thématiques: 1) schizophrénie, 2) troubles bipolaires et dépressions, 3) troubles du comportement TOC – autisme.

Une double lecture des articles sélectionnés a été faite avec une grille d'analyse pour l'évaluation des techniques sérologiques, grille conçue par le groupe.

Une grille de lecture standardisée permettant l'évaluation de la qualité des critères utilisés pour la classification des troubles psychiatriques des patients pour chacune des pathologies évoquées ci-dessus doit être faite par les cliniciens (neuro-psychiatres) aidés du Pr Binquet.

Un rapport d'évaluation de cette littérature sera rendu à l'InVS et un ou plusieurs articles seront rédigés, associant l'ensemble des membres de ce groupe de travail.

Ce travail est donc toujours en cours.

**4- Une étude médico-économique** sur le programme français de dépistage de la toxoplasmose congénitale avait été envisagée en 2015 par le CNR (Pôle Epidémiologie) avec Santé Publique France (M. Tourdjman). Elle s'est avérée difficile à conduire.

Par ailleurs, une thèse en économie de la santé est menée par une doctorante de l'Unité de Recherche Clinique- Réseau d'aide méthodologique du CHU de Dijon (CIC-EC du CHU de Dijon, INSERM CIE1), en lien avec l'HAS (faisant suite au travail d'évaluation menée en 2009 par l'HAS sur l'évaluation du programme de dépistage de la toxoplasmose congénitale). Elle est intitulée « Utilisation du critère d'efficacité dans l'évaluation des politiques de santé : l'exemple du dépistage de la toxoplasmose congénitale en France » ; I. Villena ainsi que le Dr M. Wallon (membre du réseau Toxosurv) sont dans le comité de pilotage. Les résultats de cette thèse couplés à d'autres indicateurs (notamment ceux issus de la surveillance des toxoplasmoses congénitales) pourront guider les autorités de santé dans leur décision de poursuite ou modifications du programme de dépistage pratiqué en France. Une réflexion sera menée en 2017 avec le Laboratoire Associé Pôle Sérologie pour réfléchir à la nature des techniques à mettre en œuvre afin de réduire le coût du dépistage.

**5- Poursuite de la collaboration avec le LNR** dans le cadre de l'USC Epitoxo et contribution aux études de surveillance dans la faune sauvage à la demande du LNR, de LVD ou autres organismes. Ces travaux permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de la toxoplasmose. Les génotypes seront réalisés par le Pôle Souches du CNR.

## **8.2 Perspectives du Pôle Souches**

Dans le cadre de la nouvelle mandature, le projet du pôle souche visera à :

### **1- Approfondir la caractérisation génétique des souches :**

1. Redéfinition avec 15 marqueurs microsatellites les échantillons de la collection du CNR antérieurs à 2010 (hors type II) qui n'ont pas bénéficié d'un typage complet

2. Reclassement des génotypes atypiques dans les différents haplogroupes définis par séquençage de 5 introns (selon la publication de Khan et al. 2007)

3. Evaluation de l'apport de techniques de séquençage dans les objectifs d'analyse des souches (génotypage, échanges génétiques, gènes associés à la résistance), grâce notamment au renforcement de l'équipe du pôle souche par un nouveau chercheur, le Dr F. Ariey, CHU Cochin, ayant une expertise reconnue dans le séquençage et son interprétation.

**2- Renforcer le réseau pour un recueil des souches et ADN** toxoplasmiques en provenance de régions sous représentées actuellement (en métropole et hors métropole)

**3- Renforcer les coopérations avec les autres laboratoires associés**, notamment avec le Pôle Sérologie pour la mise en place de **techniques de sérotypage**.

**4- Mettre à disposition le questionnaire en ligne** mis en place pour la déclaration des souches isolées de toxoplasmose acquise (immunodéprimés et immunocompétent) pour un recueil des cas de ces formes cliniques.

### **8.3 Perspectives du Pôle Sérologie 2017-2022**

#### **1-Activité d'expertise**

1. Poursuite de la gestion de la bibliothèque du CNR constituée de sérums spécifiques permettant de réaliser les évaluations des réactifs.

2. Poursuite des expertises multicentriques indépendantes.

3. Une exploration de nouveaux outils de diagnostic sérologique pour la toxoplasmose congénitale et la toxoplasmose oculaire. Dans le cadre de la toxoplasmose congénitale, du fait de la rareté des échantillons sériques (aussi bien en nombre qu'en quantité et volume) nous allons étudier dans un premier temps la sensibilité et la spécificité des techniques immunologiques (mais aussi moléculaires en association avec le pôle de biologie moléculaire) en colligeant l'ensemble des données recueillies par le pôle épidémiologie depuis 2006 dans le cadre de ToxoSurv.

4. Facilitation de l'émergence de nouveaux outils de diagnostic plus polyvalents adaptés à l'épidémiologie de l'infection en France. Les deux premières années permettront de développer des antigènes recombinants issus de protéines majeures du parasite en remplacement des antigènes bruts qui sont responsables de la grande disparité des résultats observés entre les techniques. (Collaboration Pôle Souches)

#### **2- Activité, formation et information**

5. Poursuite des conseils et formation aux biologistes dans le cadre du choix des techniques à mettre en œuvre en fonction de leurs besoins avec une mise à jour des guides méthodologiques déjà parus. Sur ces bases, il sera envisagé de créer un logiciel expert d'interprétation qui sera aussi employé pour la formation dans le cadre d'un site d'autoformation.

6. 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 dans le cadre d'une aide à l'accréditation selon la norme ISO15189.

#### **3- Contribution à la surveillance sérologique**

7. Registre des toxoplasmoses oculaires : Il sera nécessaire d'ouvrir un registre des toxoplasmoses oculaires en collaboration avec le pôle épidémiologie afin qu'en parallèle des déclarations de toxoplasmoses congénitales nous puissions déclarer les toxoplasmoses oculaires.

8. Caractérisation des souches infectantes par sérotypage: La virulence de la souche du toxoplasme est à mettre en relation avec la sévérité clinique dans bon nombre de dossiers

cliniques toutefois le parasite reste indétectable chez les sujets immunocompétents même par biologie moléculaire (Pôle souche). Nous allons démarrer le développement de diverses techniques immunologiques capables de prévoir la nature de la souche infectante sur la base d'une reconnaissance de sites polymorphiques de protéines majeures du parasite.

#### **4- Contribution à l'alerte**

9. Constitution d'un groupe de travail afin d'effectuer une analyse médico-économique du schéma diagnostic actuel en fonction de la prévalence décroissante amenant un plus grand nombre de la population féminine à se faire surveiller en cas de gestation, une augmentation de la population des sujets immunodéprimés et une mise en lumière des cas de toxoplasmoses oculaires par l'amélioration progressive des techniques de diagnostic. Il faut donc déterminer la nature des techniques à mettre en œuvre pour obtenir le meilleur rapport coût-bénéfice afin de permettre à la fois de déterminer le risque de TC, de mettre en œuvre un traitement précoce tout en garantissant un usage optimal des moyens financiers alloués institutionnellement. Cette évaluation médico-économique doit s'effectuer pour toutes les formes de diagnostic sérologique de la toxoplasmose (toxoplasmose congénitale, toxoplasmose opportuniste et toxoplasmose oculaire).

Ces travaux seront effectués par le Laboratoire Associé Pôle Sérologie en collaboration avec le Pôle Epidémiologie et des économistes de la Santé.

### **8.4 Perspectives du Pôle Biologie Moléculaire 2017-2022**

#### **Problématique et besoin :**

La mission principale de ce Laboratoire Associé (LA) se situe dans le domaine de l'expertise du diagnostic moléculaire. L'objectif général de ces missions d'expertise reste l'amélioration globale et l'"homogénéisation" du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en France, avec deux grands axes :

1) Contribuer à l'évaluation des pratiques et méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose.

2) Contribuer à et à l'homogénéisation ("standardisation") et à l'amélioration globale des 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) en vue de l'évaluation et de la standardisation du 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.

#### **Travaux d'expertise :**

##### **1. Travaux d'évaluation de techniques ou de pratiques envisagés : 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.

##### **1-1 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 des deux mandats quinquennaux précédents ; elle reste une pierre angulaire de l'ensemble de ce projet. Ces différentes formes de "ressources" sont 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 CNR.

#### Matériel parasitaire "étalon" et gamme "standard" :

Le L.-A. 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 (Varlet-Marie E. et al., J. Clin. Microbiol. 2014). Les gammes "standard" continueront à être distribuées aux laboratoires du réseau du CNR, accompagnées de protocoles stricts d'utilisation, et en demandant en contrepartie un retour sur les résultats obtenus.

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 ou de couche leucocyto-plaquettaire (CLP), voire de placenta. Notre longue expérience en la matière nous indique que ce matériel doit nécessairement être lyophilisé. Cette étape est plus délicate que celle concernant le liquide amniotique 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 toxoplasmose à la naissance et chez l'immunodéprimé, au niveau national. Le matériel étalon devra concerner les deux matrices utilisées par les différents centres, sang total et CLP, qui peuvent être obtenues auprès de l'EFS. Deux questions restent à régler pour ces types d'échantillons : (i) l'homogénéité du mélange de parasites intracellulaires dans du sang ou de la CLP ; (ii) l'étape de lyophilisation proprement dite. Des gammes seront également constituées avec ce matériel étalon, en vue de la quantification des charges parasitaires chez le patient immunodéprimé.

### **1-2 Evaluation des performances des méthodes de diagnostic moléculaire**

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

a) Le **Contrôle de Qualité Externe (CQE) national** en Diagnostic moléculaire de la Toxoplasmose, organisé par ce LA et placé depuis 2007 sous l'égide du CNR, remplit en grande partie ce rôle. Il doit aujourd'hui encore évoluer et 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 ci-dessus utilisant sang, couche leucocyto-plaquettaire et placenta.

b) **Témoin positif de plaque et calibrateur externe de quantification** : A ce jour, seul un tiers des laboratoires utilisent un témoin positif de plaque; or ce contrôle est un élément important des bonnes pratiques de laboratoire et, dans le cadre de l'accréditation des laboratoires selon la norme ISO 15189, son utilisation devrait se généraliser. Des concentrations plus faibles que ci-dessus pourront également être 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 pourront servir à établir des représentations de Levey-Jennings, préalable indispensable pour appliquer les règles de Westgard. De plus, dans le cadre de la quantification, ces calibrateurs auront également pour objectif de "re-calibrer" de façon plus précise les gammes de quantification mentionnées ci-dessus (en particulier pour les appareils Roche®).

c) D'**autres évaluations** seront mises en place, de façon moins formelle et plus personnalisée, basées sur les différentes formes de matériel parasitaire "standard" mentionnées ci-dessus. Des concentrations définies, accompagnées d'un protocole précis, seront envoyées sur demande aux utilisateurs et les résultats discutés avec le L.-A. Le cas

échéant, des pistes d'amélioration possibles seront ensuite suggérées, tenant compte des valeurs considérées comme "seuils" définies par le GdT.

### **1-3. 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.

Dans le cadre de l'étude sur la quantification absolue de la charge parasitaire et de la corrélation entre charge parasitaire et pronostic fœtal, il sera demandé aux laboratoires du réseau d'extraire un flacon de gamme par leur méthode d'extraction. Ceci permettra d'avoir à disposition de l'ADN extrait par différentes méthodes d'extractions manuelles et automatisées. Il est prévu que le L.-A. utilise cet ADN pour réaliser la quantification des échantillons envoyés par les centres. Mais une partie de cette ADN sera aussi envoyée à d'autres laboratoires du GdT afin qu'ils testent ces différentes extractions avec leur méthode PCR. La quantité importante de résultats ainsi obtenus permettra de mieux cerner l'influence de la méthode d'extraction sur la performance de la PCR-Toxoplasma et de définir les "couples" extraction-PCR les plus adaptés en vue de recommandations.

### **1-4. Evaluation de techniques et méthodes**

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 permettent de classer les méthodes en termes de performances et de proposer des recommandations. En 2015, 8 laboratoires utilisent encore une méthode qu'ils sont seuls à utiliser (le plus souvent qu'ils ont développée). En plus d'être un facteur d'hétérogénéité des méthodes, voire des performances, cela empêche l'évaluation de la méthode au sein d'un groupe de pairs dans le cadre de l'accréditation. Cette évaluation peut être extrêmement utile en termes de recommandations.

Ces études de comparaison de méthodes doivent être multicentriques afin de valider les résultats en tenant compte des différences existant entre les méthodes (réactifs, appareils, variantes de mise au point...), mais tout en réalisant la méthode entièrement en "intra-centre" afin d'éviter les biais importants liés à la non-compatibilité entre différentes étapes de la méthode (extraction, amplification) entre centres. D'autre part, elles doivent se concentrer sur les méthodes commerciales, qui doivent être évaluées de façon objective lors de leur mise sur le marché.

Les trousse les plus utilisées en France et en Europe, BioEvolution®, EliTech® et TibMolBiol®, ont été évaluées par le Pôle Biologie moléculaire du CNR (Filisetti D\*, Sterkers Y\* et al., J. Clin. Microbiol. 2015; Robert-Gangneux et al., J. Clin. Microbiol. 2017; et Varlet-Marie et al., manuscrit en préparation). La prochaine trousse à évaluer pourrait être celle de InterLab Service® ou de Progenie Molecular®.

### **1-5. Evaluation et amélioration de la quantification absolue de la charge parasitaire**

L'homogénéisation de la quantification "absolue" (en toxoplasmes/mL) de la charge parasitaire reste un des objectifs importants du CNR; celle-ci reste une problématique importante, qui est mal étudiée dans le cadre de la toxoplasmose congénitale et pose des problèmes en routine (cf. infra). En effet, l'un des problèmes majeurs constatés au cours du CQE national 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). Une amélioration de ce problème ne peut se concevoir qu'à moyen terme et devra être menée à bien sur plusieurs années, en trois étapes :

- Le problème de l'homogénéisation de la quantification entre les centres pose directement, indépendamment de la méthode de PCR utilisée, la question de la gamme de référence témoin utilisée pour la quantification. Pour cela, le L.-A. continuera à distribuer les gammes "standard", ce qui a déjà permis une amélioration de la situation.
- Le problème des erreurs de quantification observées dans un centre donné devra être traité individuellement par contact direct entre le CNR et le centre concerné.
- Enfin, la variation entre souches du nombre de répétitions de la cible ADN actuellement utilisée pour la quantification doit continuer à faire l'objet d'une étude spécifique (cf. infra).

## 2. Travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR

### **2-1. Evaluation de la stabilité de la cible ADN rep59**

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, moyennement répétée en tandem, dont le nombre de répétitions n'est connu qu'approximativement (autour de 300) et pour une souche de référence. Cependant, comme de nombreuses séquences répétées non-codantes dites minisatellites, elle souffre peut-être de variations du nombre de copies présentes entre les souches, ce qui limiterait considérablement son intérêt pour la quantification des charges parasitaires; elle a même été suspectée d'être absente dans certaines souches où la contamination était d'origine tropicale (Wahab et al., J. Clin. Microbiol. 2010). Au vu de l'importance croissante de la quantification dans ce diagnostic, il est important de s'assurer du nombre de copies aussi exact que possible de cette séquence et de sa stabilité entre les souches de toxoplasmes (donc entre patientes). Une étude publiée en 2012 par Costa & Bretagne (J. Clin Microbiol. 2012) a montré un nombre de copies beaucoup plus faible que ce qui avait été initialement décrit. Le Pôle souhaite vérifier ces données par de nouvelles expérimentations.

La disponibilité de techniques de séquençage à haut débit (NGS) au sein du Pôle (L-S de Paris-Cochin) incite ce dernier (en collaboration avec Frédéric Arieu, Parasitologie-Mycoologie Paris-Cochin) à démarrer une étude visant à déterminer la présence et le nombre de cette cible ADN chez des souches d'origines diverses. Pour cela, les données de séquençage complet de génome d'isolats de *T. gondii* disponibles seront analysées (ToxoDB; Lorenzi et al., 2016). L'ensemble des séquences (estimé à des millions de reads) sera aligné. Le nombre de répétitions des séquences d'ADN (Copy Number Variation ou CNV) sera étudié par rapport à des séquences connues en copie unique. La cible plus classique du gène B1 pourra également être incluse dans cette analyse.

### **2-2 Recherche de nouvelles cibles ADN**

Les doutes exprimés sur la validité de la cible ADN rep529 nous poussent à rechercher une autre cible potentiellement plus adéquate, aussi répétée mais plus stable (si cela se confirme) entre souches et entre pays. Les données de NGS mentionnées ci-dessus pourront également être utilisées dans ce but.

### **2-3 Corrélation entre charge parasitaire et pronostic fœtal**

Dans la littérature, seules deux études (Costa et al., *Prenatal Diag.* 2001 et Romand et al., *Am J Obst Gynecol* 2004) se sont intéressées à la corrélation entre la charge parasitaire dans le liquide amniotique (LA) et la gravité du pronostic fœtal. L'une de ces études a clairement mis en évidence une telle corrélation (Costa et al.) mais ces deux études sont contradictoires et manquent de puissance. A l'occasion d'une étude comparative multicentrique évaluant une méthode de PCR, le Pôle s'est intéressé à la quantification des Toxoplasmes dans le liquide amniotique, au moyen de la gamme standardisée mise au point au sein du GdT. Une étude préliminaire réalisée au sein du groupe de travail du Pôle biologie moléculaire et portant sur 59 échantillons de LA avait confirmé. Les résultats préliminaires, s'ils confirment le large spectre des concentrations possibles, allant de 0,001 à 765 Toxoplasme/ml, avec une médiane très basse à 7 Toxoplasmes/ml, montrent a priori une

absence de corrélation entre la charge parasitaire dans le liquide amniotique infecté et le pronostic chez l'enfant, ce qui contredit les données publiées jusqu'alors. Cependant, la non-conservation des liquides amniotiques et le non-recueil des données cliniques par certains centres a réduit la cohorte, donc la puissance de l'analyse, empêchant d'en déduire des conclusions fermes.

Les deux écueils sont les suivants : (i) pris individuellement, le recrutement d'un centre ne permet pas d'avoir une cohorte suffisante et (ii) du fait de la variabilité des méthodes et des performances entre les centres, une étude simplement multicentrique n'est pas envisageable. Un nouveau projet d'étude multicentrique sur ce thème a donc été initié en 2015, avec un appel à participants au sein du réseau du CNR (étude coordonnée par les L-S de Rennes et Grenoble, et le L-A de Montpellier).

Au total, 15 centres ont manifesté leur intérêt pour y participer. Le projet repose sur la ré-analyse des liquides amniotiques positifs déclarés dans la base Toxosurv, et la quantification des charges parasitaires par une même technique PCR dans un même centre, à l'aide de la gamme calibrée du L.-A. de Montpellier. Dans cette base sont incluses toutes les données cliniques et paracliniques permettant d'évaluer la gravité de la toxoplasmose congénitale. Entre 2007 et 2013, 262 cas de toxoplasmoses congénitales avec amniocentèse positive ont été identifiées; et un minimum de 172 échantillons pourra être inclus. Afin d'augmenter encore le nombre d'échantillons, l'étude a été étendue aux années 2014, 2015 et 2016. Un flacon de gamme "standard" sera adressé aux centres qui transmettent de l'ADN, afin qu'ils l'extraient avec leur méthode "maison". Cet extrait sera ensuite utilisé par le centre quantificateur pour réaliser la quantification des échantillons fournis en parallèle. Cette précaution permettra de corriger d'éventuels biais de quantification qui seraient dus à la méthode d'extraction du demandeur et à la non-optimisation de celle-ci avec la PCR du centre quantificateur (cf. notion de "couple extraction-PCR" déjà citée). Pour l'instant, le centre quantificateur prévu est le L-A de Montpellier.

Un biais important qui a freiné cette étude est la possibilité de grandes variations du nombre de copies de la cible rep529 entre les souches de *Toxoplasma* (Michael Grigg, comm. personnelle) qui, si elle est confirmée, serait source de biais importants dans la quantification. Pour cette raison, nous avons décidé de quantifier les charges parasitaires en utilisant deux voire trois cibles ADN différentes (rep529, B1 et SOD), ce qui augmente la complexité et le coût de l'étude.

#### **2-4 Prématurité et retard de croissance intra-utérin au cours de la toxoplasmose congénitale**

Dans le cadre du DHU "Risque et grossesse" et du CNR, le L-S de Paris-Cochin souhaite, en collaboration avec le Pôle "Epidémiologie" du CNR, évaluer le risque de prématurité et de petit poids de naissance dans la toxoplasmose congénitale. Il s'agirait d'une étude rétrospective de cohorte avec 3 groupes :

- 1 groupe malade (enfants dont la mère a fait une infection pendant la grossesse et infectés) = TC
- 1 groupe non malade (enfants dont la mère a fait une infection pendant la grossesse et qui ne sont pas infectés) = non TC
- 1 groupe de référence (enfants de l'enquête périnatale 2011)

Les données recueillies permettraient d'analyser le terme moyen de la grossesse et le poids de naissance moyen dans ces différents groupes et d'autre part d'analyser ces paramètres selon la date de l'infection maternelle. Les données nécessaires pour les groupes TC et non TC sont : la date de début de grossesse; la date de naissance de l'enfant; la date de l'infection maternelle ( en SA); le terme de la grossesse (SA) ou la date de l'IMG le cas échéant; le poids de naissance; et le génotype de la souche. La participation de pédiatres à cette étude permettrait de récupérer les données du terme et du poids de naissance. Il sera aussi possible de faire une enquête auprès des mères afin de récupérer ces données du carnet de santé de l'enfant.

En se basant sur les résultats de l'étude de Freeman et al. 2005, l'échantillonnage minimum dans chacun des groupes TC et non TC que nous avons calculé pour pouvoir observer une différence serait de 90 sujets. Ceci oblige donc à faire appel à l'ensemble du réseau du CNR.

## 2-5. Diagnostic biologique de la toxoplasmose oculaire

### Apport de l'étude du métagénome de *T. gondii* dans le diagnostic de la toxoplasmose oculaire (L-S de Paris-Cochin).

Une étude indépendante initiée par l'Institut Cochin cherche à évaluer l'apport du métagénome d'agents pathogènes, dont *T. gondii*, à partir des fluides oculaires pour le diagnostic des endophtalmies infectieuses. En effet, le faible volume des prélèvements d'humeur aqueuse ou vitrée peut-être une limite dans le diagnostic microbiologique. Cette étude est basée sur des extraits d'ADN de fluides oculaires de patients pour lesquels une recherche de chorioretinite toxoplasmique a été réalisée en PCR. Les données cliniques, microbiologiques et les diagnostics définitifs des patients sont connus. Les techniques de NGS sont effectuées sur la plateforme de séquençage à haut débit de l'Institut Cochin. Les concentrations d'ADN des échantillons sont en général faibles (<1 ng/μL), aussi, il faudra déterminer si une amplification non spécifique de l'ADN est nécessaire avant le séquençage massif. Il faudra également vérifier s'il est nécessaire d'éliminer au préalable l'ADN humain pour augmenter la sensibilité de la détection d'ADN d'agents pathogènes. Cette étude est en cours et devrait s'étendra sur plusieurs années.