



Étude de la corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire dans la toxoplasmose humaine

Marine Sicello

► To cite this version:

Marine Sicello. Étude de la corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire dans la toxoplasmose humaine. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02344510

HAL Id: dumas-02344510

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02344510>

Submitted on 4 Nov 2019

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

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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 19 septembre 2019

Par Mme SICELLO Marine
Née le 18 mars 1992 à Digne Les Bains

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**ÉTUDE DE LA CORRÉLATION ENTRE LA
RÉPONSE HUMORALE ET LA RÉPONSE
CELLULAIRE DANS LA TOXOPLASMOSE
HUMAINE**

----oOo----

JURY

Président : Mme le Professeur Nadine AZAS

Membres : M. le Professeur Stéphane RANQUE
Mme le Docteur Coralie L'OLLIVIER
Mme le Docteur Sarah AHERFI

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angelique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Philippe CHARPIOT
M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI
M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Michèle LAGET
M. Michel DE MEO
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou
Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORE
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Joel VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Remerciements

Aux membres de mon jury :

Ma présidente de jury : Mme le Pr Nadine AZAS

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie de l'attention que vous avez bien voulue porter à mon travail. Merci également pour la qualité des enseignements reçus au cours de ma formation. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Ma Directrice de thèse : Mme le Dr Coralie L'OLLIVIER

Je tiens à te remercier tout particulièrement de m'avoir proposé ce sujet et de m'avoir dirigée tout au long de ce projet. Je t'exprime toute ma gratitude pour la disponibilité dont tu as fait preuve à mon égard. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises durant mon stage d'interne en parasitologie, et de m'avoir montré ce qu'est un véritable biologiste. Ta bonne humeur communicative et tes encouragements m'ont été d'un grand soutien .

Ma reconnaissance et mon respect envers toi sont immenses.

Mes juges :

M. le Pr Stéphane RANQUE

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mme le Dr Sarah AHERFI

Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce jury, de m'avoir guidée lors de mon premier stage d'interne, de ta bienveillance, et surtout de ta gentillesse à mon égard. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée tant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

A ma famille :

Mes parents :

Papa, Maman, un immense merci pour le soutien quotidien que vous m'apportez, pour la transmission de vos valeurs et pour mon éducation et d'avoir toujours cru en moi pendant les années de concours. Merci de m'avoir fait grandir dans un environnement plein d'amour. Merci pour tout ce que vous avez fait et faites pour moi, je vous en suis et serais éternellement reconnaissant. Je suis fière d'avoir des parents comme vous.

Maman, je te remercie particulièrement pour ta participation dans cette thèse. Nous allons fêter cette thèse comme il se doit, sans modération !!

Ma sœur

Merci ma sœur d'amour pour ce soutien sans faille depuis que nous sommes enfants, pour tous ces instants passés ensemble, pour «*ton imagination* » (accent espagnol) et ta folie d'artiste qui me font rire ainsi que pour ton regard franc et honnête, qui m'aide à avancer. Tu trouves toujours les mots en toute circonstance.

Mes grands parents

Merci pour tous ces bons moments en famille, pour votre soutien, votre bienveillance, et pour le partage de vos expériences, qui fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

L'ensemble de ma famille

Merci de m'avoir soutenue pendant ces 9 ans de près et de loin.

A mes amis et aux belles rencontres :

Mes chichis : Alys, Emilie et Nolwenn. Une amitié qui dure depuis tant d'années : De Bandol jusqu'à la Croatie en passant par salou.... J'ai une chance immense de vous avoir près de moi. Merci de m'avoir soutenue de près et de loin pendant ces 9 années d'étude.
Alys : Ma petite bravoute, merci de me rassurer dans mes moments de faiblesse et pour ces merveilleux moments de joie que l'on a passé ensemble.

Emilie : ma plus vieille amie, merci d'avoir été là depuis l'âge de nos 2 ans, d'avoir fait ce long chemin avec moi.

Nolwenn : Ma copilote, mon acolyte de soirée. Nous formons vraiment un duo de choc endiablé. Merci pour ta bonne humeur, pour ton enthousiasme.

Mes copains marseillais :

Florian : Flo, un immense merci pour tous tes conseils, pour ton aide, pour tous ces mails corrigés, et pour cette thèse. Merci également pour ces bons moments passés ensemble, ces sorties, ces week-ends qui ne vont pas s'arrêter là. Prochain destination ➔ Edimbourg ?? (A ce qui paraît la bière est bonne ahaha)

Thomas : Totocaille, mon binôme des essais cliniques (je suis nostalgique de cette belle époque) : Continue à me faire rire avec tes blagues. Et tu sais il n'est jamais trop tard pour partir en Norvège élever des saumons.

Les cagoles :

Emma : Ma beauté, merci d'avoir été présente pendant tous ces stages, pour tous ces bons moments, ces sorties au R2, ces après midis « formation continue bronzage ». Nous allons finir cet internat sur une plage paradisiaque toutes les deux au top !

Celia : Ma poulette, merci pour ces apéro d'été sur ta terrasse, pour ces séances de coaching, pour ton soutien dans les situations les plus sportives et ta patience (ahaha).

Charlotte : Cha, cette complicité qui existe entre nous, me donne l'impression que ça fait des années que nous nous connaissons. Merci pour ta bonne humeur, pour ton soutien et ta confiance en toute circonstance surtout quand il faut enlever tes lentilles. Merci d'avoir été le volontaire n° 2 de ma cohorte.

Alison : Tout a commencé entre nous par une histoire de fraise ...puis les soirées les vacances, les sorties sont enchainées.

Merci d'avoir été présente pendant ces 9 ans.

Guillaume : Merci pour m'avoir soutenue de loin pendant ces 9 ans d'étude, d'avoir participé ou plutôt subi ce mur des lamentations, pour ces cactus offerts qui n'ont finalement pas survécu à la pollution marseillais (ou tout simplement à ma compagnie ahah).

Les belles rencontres de mon internat : Merci d'avoir fait un bout de chemin avec moi pendant l'internat : Maxime mon cobaye pour cette thèse, Pauline, Lakhdar, Antoine, Tarek

L'équipe d'hémato du laboratoire d'Aix en Provence :

Un immense merci pour cette année passée auprès de vous, qui restera la plus belle année de mon internat. Merci pour cette leçon d'humanité, pour votre accueil et surtout pour votre sincérité. Aller en stage avec le sourire et l'envie de vous retrouver a été mon quotidien pendant un an. Merci aux volontaires qui ont permis que cette thèse se réalise.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Introduction.....	2
PARTIE 1 : <i>Toxoplasma gondii</i> , agent causal de la toxoplasmose	3
1. Historique	3
2. Taxonomie	3
3. Les différentes formes parasitaires.....	4
3.1 Tachyzoïtes	4
3.2 Bradyzoïtes	6
3.3 Sporozoïtes	6
4. Cycle biologique	7
4.1 Cycle sexué	7
4.2 Cycle asexué	8
5. Genotype et virulence de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
PARTIE 2 : Réponse immunitaire au cours de la toxoplasmose	12
1. Invasion	12
2. Mise en place de l'immunité innée	13
2.1 Cellules de l'immunité innée	14
2.1.1 Les cellules dendritiques (CD)	14
2.1.2 Les monocytes / macrophages (Mn/MO)	14
2.1.3 Les polynucléaires neutrophiles (PNN)	14
2.1.4 Les cellules natural Killer (NK)	15
2.2 Synthèse IFN- γ	15
2.3 Synthèse TNF- α	16
3. Mise en place de la réponse adaptative.....	16
3.1 Présentation de l'antigène parasitaire	17
3.2 Les lymphocytes CD4+	17
3.3 Les Lymphocytes T CD8+	18
3.4 Les lymphocytes T CD25+	18
4. Prévention des phénomènes immuno-pathologiques : réponse Th2 régulatrice	19
5. Immunité humorale.....	20
6. Phase chronique	22
7. Particularités de la réponse immunitaire chez la femme enceinte	23
Partie 3 : Toxoplasmose et grossesse.....	25

1.	Données épidémiologiques	25
2.	Transmission materno-fœtale : toxoplasmose congénitale.....	25
3.	Diagnostic sérologique	26
3.1	Réglementation	26
3.2	Cinétique des anticorps au cours d'une primo-infection	27
3.3	Techniques sérologiques de détection des IgG.....	28
3.3.1	Techniques de dépistage	29
3.3.2	Technique de confirmation	30
3.4	Interprétation des sérologies de dépistage à titres faibles d'IgG	31
PARTIE 4 : Etude de la corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire dans la toxoplasmose humaine		33
1.	Matériels.....	35
1.1	Population étudiée	35
1.2	Réactif : Antigènes de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
2.	Méthodes	35
2.1	Tests mettant en évidence la réponse humorale.....	35
2.2	Tests mettant en évidence la réponse cellulaire.....	37
2.2.1	Culture et activation	38
2.2.1.1	Culture cellulaire en microplaque stérile Cellstar®	38
2.2.1.2	Culture cellulaire sur tube Falcon®	38
2.2.2	Dosage de l'IFN- γ	38
2.2.3	Dosage du TNF- α	39
2.2.4	Marquage des lymphocytes T CD25+ en cytométrie en flux.....	40
3.	Analyse statistique	41
4.	Résultats	42
4.1	Sérologie toxoplasmose à L'IHU	42
4.2	Résultats sérologiques.....	43
4.3	Dosage de l'IFN- γ	45
4.4	Dosage du TNF- α	48
4.5	Résultats de la cytométrie en flux	50
4.5.1	Comparaison des lymphocytes activés (CD4+ CD25+) des groupes témoin négatif/ témoin positif PHA / sujet après activation par <i>T.gondii</i>	51
4.5.2	Comparaison des lymphocytes activés (CD4+ CD25 +) des sujets avec un profil négatif / profil douteux/ profil positif.....	52
4.5.3	Analyse des lymphocytes CD8+ CD25+ des groupes témoin négatif / témoin positif PHA / sujets après activation par <i>T. gondii</i>	54
Partie 5 : Discussion.....		55

Conclusion	63
Liste des illustrations	65
Liste des tableaux	67
Annexes	68
Bibliographie.....	71

Liste des abréviations

CLIA : ChemiLuminescence Immuno Assay

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMIA : Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay

CNR : Centre National de Référence

DL : Dose Létale

ECLIA : Electro Chemiluminescence Immuno Assay

EIA : enzyme immunoassays

ELFA : Enzyme linked fluorescent Assay

ELISA : Enzyme -linked immunosorbent assay

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

HAS : Haute Autorité de Santé

Ig : immunoglobuline

IHU : Institut hospitalo-universitaire

IFN- γ : Interféron Gamma

IL : Interleukine

iCD : Cellule Dendritique immature

iNOS : Oxyde Nitrique synthase inductible

LB : Lymphocyte B

L CD4 : Lymphocytes T CD4

L CD8 : Lymphocytes T CD8

L NK : Lymphocytes Natural Killer

mCD : Cellule Dendritique mature

MO : Macrophages

NK : Natural Killer

NO : Oxyde Nitrique

PCR-RFLP : PoLymorphism Chain Reactio- Restriction Fragment Lenght Polymorphism

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

UI /mL : Unité Internationale par millilitre

RLO : Radicaux Libres de l'Oxygène

RNI : Radicaux Libres du Nitrogène

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

SAG : Antigen Surface

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

STR : Short Tandem Repeats

Th : T helper

TNF- α : Tumor Necrosis factor alpha

VP : Vacuole Parasitophore

WB : Western Blot

Introduction

La toxoplasmose apparaît comme l'une des affections parasitaires les plus fréquentes. Elle s'avère généralement bénigne, mais sa survenue pendant la grossesse peut avoir des conséquences critiques sur l'enfant à naître. En effet la toxoplasmose congénitale est due à la contamination du fœtus par *Toxoplasma gondii* à la suite d'une primo-infection maternelle. Elle peut être responsable de complications cérébrales (calcifications intracrâniennes, hydrocéphalie), oculaires (choriorétinite, atrophie optique) et viscérales.

En France on estime à environ 6000 le nombre de séroconversions et à 200-300 les cas de toxoplasmose congénitale par an. Un système de dépistage pour les femmes enceintes a été mis en place depuis 1978. Une surveillance sérologique mensuelle des femmes enceintes séronégatives est obligatoire de la déclaration de grossesse jusqu'à l'accouchement. Pour les femmes enceintes immunisées, aucun suivi n'est nécessaire. Quelquefois il arrive que le titre des anticorps se révèle très faible : dans ce cas la difficulté est de définir le profil sérologique. Lors d'une nouvelle infection, la réaction face aux parasites ne peut pas être prédite. En effet la réponse immunitaire contre le *T. gondii* est de type cellulaire faisant intervenir principalement les lymphocytes T et les cytokines tels que l'IL12, l'IFN- γ et le TNF- α . Les anticorps ayant un rôle mineur dans la réponse immunitaire restent le principal moyen pour diagnostiquer la toxoplasmose chez l'homme.

Nous avons voulu évaluer la corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire dans l'infection à *T. gondii* chez l'Homme.

Le titre d'anticorps a été comparé aux taux de cytokines TNF- α et IFN- γ obtenus par technique ELISA ainsi qu'au pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ activés déterminé par cytométrie en flux in vitro après stimulation des lymphocytes T par des antigènes du *Toxoplasma gondii*.

Cette étude réalisée chez des volontaires ne présentant pas de grossesse et ayant des statuts sérologiques différents a pour objectif de définir un seuil d'immunisation et d'être extrapolée à la population de femmes enceintes.

Ainsi nous pourrions répondre à la question « faut-il considérer les femmes enceintes disposant de titres faibles d'anticorps comme immunisées et capables de protéger le fœtus ? ».

PARTIE 1 :

***Toxoplasma gondii*, agent causal de la toxoplasmose**

Toxoplasma gondii est un parasite responsable d'une anthroponose : la toxoplasmose. Cette pathologie mondialement répandue est le plus souvent bénigne mais revêt un caractère sévère si l'atteinte concerne des sujets immunodéprimés ou des femmes enceintes séronégatives.

1. Historique

Ce parasite protozoaire a été initialement décrit en 1908 par Nicolle et Manceaux suite à sa découverte chez un rongeur, à qui il doit en partie son nom, *Ctenodactylus gundi* (1). Les noms de genre et d'espèce du parasite proviennent de sa morphologie (toxon = arc et plasma = forme) et du rongeur chez lequel il a été découvert.

Par la suite, *T. gondii* a été observé chez de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux mais ce n'est que dans les années 1920, que les premiers cas de toxoplasmoses humaines ont été décrits. La mise au point des premiers tests sérologiques tel que le dye test (test de lyse) des toxoplasmes vivants) dans les années 1940, a révélé une forte prévalence de la toxoplasmose humaine (2).

Le cycle biologique de ce parasite et son mode de transmission n'ont été établis que dans les années 1960 par Hutchison (3), puis par Frenkel et Dubey dans les années 70 (4).

2. Taxonomie

Toxoplasma gondii est un protozoaire à développement intracellulaire obligatoire dont la classification est la suivante (5–7) :

Règne : Protista

Phylum : Apicomplexa

Classe : Coccidia

Famille : Sarcocystidae

Sous-famille : Toxoplasmatinae

Genre : Toxoplasma

Espèce : gondii

3. Les différentes formes parasitaires

Toxoplasma gondii existe sous trois formes, selon l'hôte et le stade infectieux (8,9) :

- Tachyzoïte
- Bradyzoïte
- Sporozoïte

3.1 Tachyzoïtes

Le terme «tachyzoïte» provient du grec tachos qui signifie rapide (4). En effet cette forme végétative auparavant appelée trophozoïte est la forme asexuée à multiplication rapide retrouvée dans tous types de cellules de l'hôte intermédiaire. Il s'agit de la seule forme capable de passer la barrière placentaire et barrière hémato-encéphalique.

Le tachyzoïte se présente sous forme de croissant, d'environ 2 sur 6 µm avec une extrémité antérieure (conoïdale) caractéristique des apicomplexes jouant un rôle dans la pénétration des cellules hôtes. Il renferme des organelles à activité sécrétoire (rhoptries, micronèmes et granules denses) et un conoïde participant à la pénétration dans la cellule. La membrane externe de cette forme parasitaire est constituée de trois couches superposées : le plasmalemmme associé à deux couches formant un complexe interne de vésicules aplaties.

On retrouve également des organites classiques comme un noyau, une mitochondrie, un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique, de nombreux ribosomes, et des grains d'amylopectine. Comme d'autres parasites du phylum Apicomplexa (*Plasmodium* spp,

Isospora sp, Cyclospora sp), *Toxoplasma gondii* possède un ADN extra-nucléaire et extra-mitochondrial contenu dans une organelle du cytoplasme ayant une structure de type "plaste".

La multiplication des tachyzoïtes se fait par endodyogénies successives, une forme de reproduction asexuée au cours de laquelle deux tachyzoïtes-filles se forment dans le parasite parent contenu initialement dans la vacuole parasitophore. Très fragile dans le milieu extérieur, sa diffusion dans l'organisme se fait par voie sanguine et lymphatique.

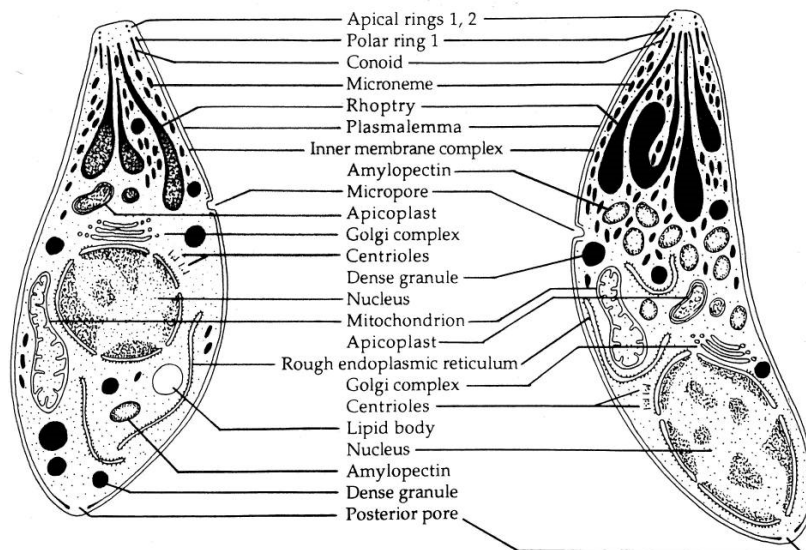


Figure 1: Structure du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*(8)

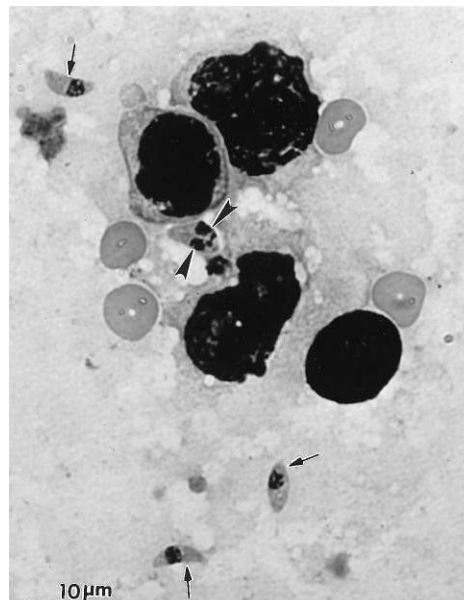


Figure 2: Tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*(8)

Tachyzoïtes se divisant : grosse flèche
Tachyzoïtes simples : petite flèche

3.2 Bradyzoïtes

Le terme bradyzoïte provient du grec « brady » (lent) et désigne la forme parasitaire qui se multiplie lentement au sein de kystes intracellulaires. Ces structures le protègent du système immunitaire de l'hôte intermédiaire et sont présentes au stade chronique de l'infection.

Les kystes grossissent à mesure que les bradyzoïtes intracytoplasmiques, dérivés des tachyzoïtes, se multiplient par endodyogénie. Leur taille peut varier de 5 μm de diamètre à 70 μm en fonction de leur localisation. Les kystes peuvent se former dans n'importe quel type cellulaire mais persisteront préférentiellement dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires et les cellules rétinienne sans déclencher de réaction inflammatoire.

Le bradyzoïte diffère peu du tachyzoïte mis à part une plus grande résistance et un niveau métabolique bas (10).

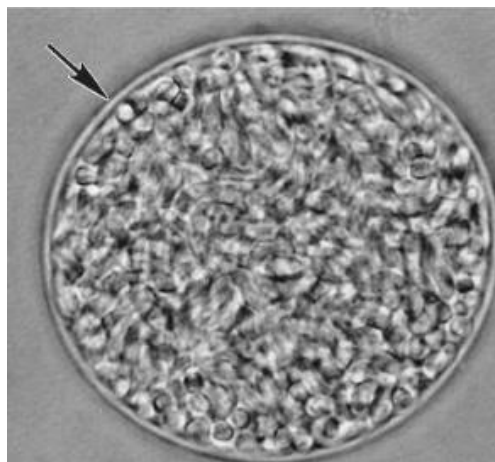


Figure 3: Bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, forme de multiplication lente, contenus dans un kyste cérébral(8)

3.3 Sporozoïtes

Le stade sporozoïte est présent dans les oocystes sporulés. Les oocystes sporulés contiennent deux sporocystes en forme d'ellipse de 6 à 8 μm et chaque sporocyste renferme quatre sporozoïtes (8). C'est la forme infestante du parasite qui résulte de la reproduction sexuée dans les cellules épithéliales de l'hôte définitif, le chat et autres félinés.

Les oocystes se développent chez l'hôte définitif avant d'être excrétés dans le milieu extérieur

par les fèces où ils sporulent et peuvent persister plusieurs mois tout en gardant leur pouvoir infectieux.

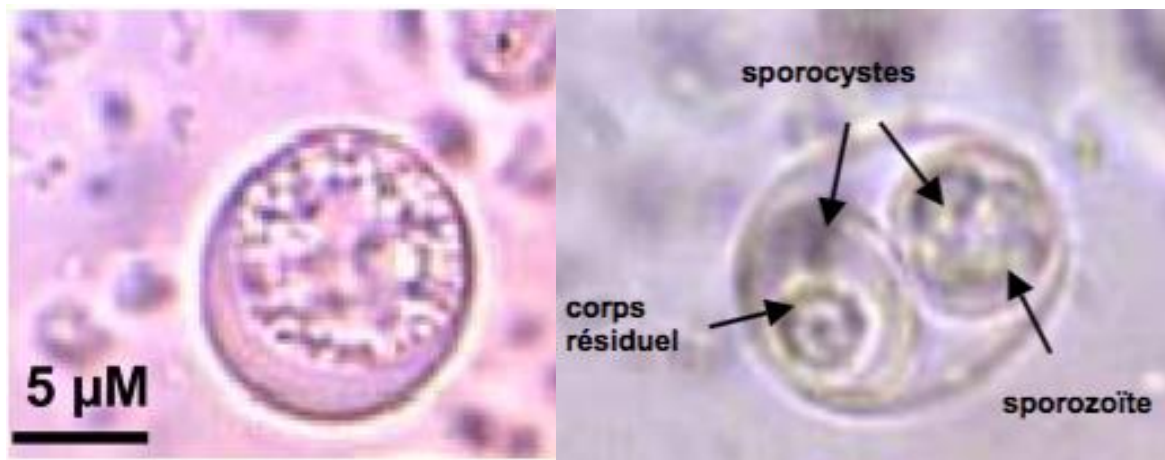


Figure 4: Oocystes de *Toxoplasma gondii* non sporulés à gauche et sporulés à droite (grossissement $\times 1\,000$)(11)

4. Cycle biologique

Toxoplasma gondii est un parasite hétéroxène. Son cycle biologique se décompose en deux phases :

- la phase sexuée qui se déroule chez l'hôte définitif : les félinés (...)
- la phase asexuée qui se déroule chez un large spectre d'hôtes intermédiaires à sang chaud : mammifères, oiseaux et Homme.

4.1 Cycle sexué

L'hôte définitif représenté majoritairement par le chat s'infecte après ingestion de kystes tissulaires provenant des proies infectées, comme les petits mammifères ou les oiseaux. Plus rarement il peut se contaminer par ingestion d'oocystes sporulés souillant la terre, les végétaux ou l'eau douce.

Dans l'épithélium de l'iléon de l'hôte définitif, les sporozoïtes (contenus dans les oocystes) ou les bradyzoïtes (contenus dans les kystes) évoluent rapidement en tachyzoïtes puis en mérozoïtes. Ces derniers se multiplient par schizogonie et se différencient en gamontes (microgamètes mâles et macrogamètes femelles) pour initier le cycle sexué.

La fécondation des macrogamètes femelles par les microgamètes mâles donne naissance à des

oocystes immatures qui sont libérés dans la lumière intestinale, puis éliminés dans les fèces du chat (trois à dix jours après ingestion de kystes).

Un chat peut produire plusieurs millions d'oocystes sans signes cliniques, après l'ingestion d'un seul kyste tissulaire. Cependant, cette excrétion a lieu sur une courte durée (une à deux semaines) dans la vie du chat.

Le développement du caractère infectieux, ou sporulation des oocystes émis dans les fèces prend deux à vingt-et-un jours sous des températures de 11 à 25 °C et des conditions d'humidité suffisante (12).

Les oocystes sont très résistants en milieu humide, aux agents physiques ou chimiques.

4.2 Cycle asexué

Chez les hôtes intermédiaires, l'infection se fait essentiellement par voie orale, après l'ingestion soit d'oocystes matures provenant d'aliments souillés, soit de kystes contenus dans des viandes infectées peu ou pas cuites (Figure 5).

L'Homme est une impasse parasitaire puisqu'il ne possède pas de prédateur carnivore.

Après ingestion d'oocystes ou de kystes, les formes parasitaires infectantes, sporozoïtes ou bradyzoïtes, sont libérées dans la lumière intestinale et se différencient rapidement en tachyzoïtes. Ceux-ci disséminent dans l'organisme par voie sanguine et pénètrent dans tous types de cellules de l'organisme. Cette phase correspond à la phase aiguë de la maladie. La réponse immunitaire chez l'Homme qui contrôle la multiplication du parasite sera détaillée dans la partie II de ce mémoire.

Les premiers kystes apparaissent une dizaine de jours après l'infection et se maintiennent dans les tissus, préférentiellement dans les neurones, astrocytes, cellules musculaires et rétinienne, lieu où l'immunité cellulaire est réduite. La persistance de ces kystes entraîne un état de prémunition chez l'hôte intermédiaire en l'absence d'immunodépression.

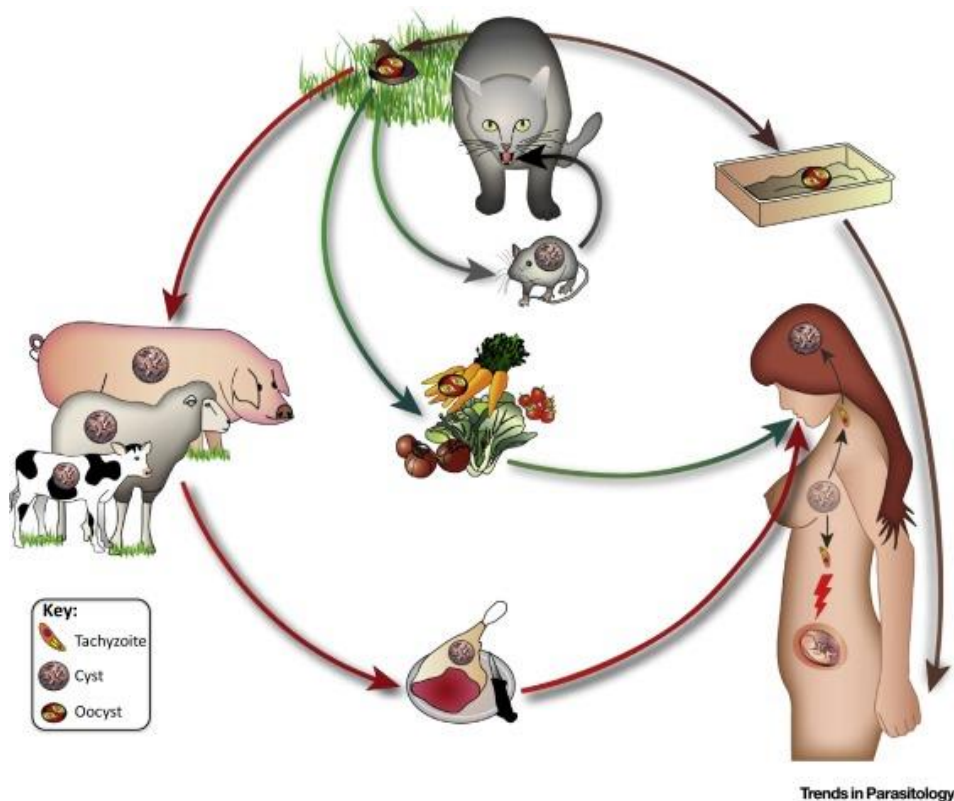


Figure 5: Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*(13)

Au final, l'Homme se contamine majoritairement par l'ingestion de kystes tissulaires contenus dans la viande infectée, et moins fréquemment par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par des oocystes sporulés ou par l'intermédiaire des mains souillées par la terre contaminée (au cours du jardinage par exemple). Dans une étude multicentrique menée en Europe, la consommation de viande était responsable de 30 à 63% des cas d'infection, tandis que le contact avec le sol représenterait 6 à 17% des cas (14).

Les kystes tissulaires restent infectieux dans les viandes réfrigérées (entre 1 °C et 6 °C) ou dans la viande hachée jusqu'à 3 semaines. Seule la congélation de la viande à -12 °C pendant au moins 3 jours est généralement efficace pour tuer les kystes. La cuisson à 67°C à cœur permet également de détruire les kystes.

La transmission congénitale verticale dont nous parlerons dans la partie III est également une voie de contamination.

Enfin des cas de toxoplasmoses après transplantation d'organes solides sont également possibles. Les kystes contenant des bradyzoïtes sont présents dans de nombreux organes et préférentiellement dans les muscles. Ainsi lors de transplantation cardiaque d'un donneur immunisé, chez un receveur non immunisé et immunodéprimé, une primo-infection à *T. gondii* à partir du greffon peut se déclarer (11).

5. Genotype et virulence de *Toxoplasma gondii*

Depuis plusieurs années des études ont été menées pour analyser la diversité génétique de l'espèce *T. gondii* grâce à des techniques isoenzymatiques (15) et de biologie moléculaire : PCR-RFLP (PoLymorphism Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) (16) et analyses de marqueurs microsatellites ou STR (short tandem repeats). Ces différents travaux ont permis de décrire plus de 290 souches.

Selon l'analyse basée sur les séquences d'introns, plus de 95% des isolats se classent en 11 haplotypes, dont 3 types sont prédominants. Ces 3 génotypes majoritaires correspondent à trois lignées clonales : I, II et III. Malgré une répartition mondiale et un cycle sexué, ces 3 clones ne diffèrent génétiquement que très peu entre eux : 1 à 2 % de différences génétiques seulement. Ainsi l'hypothèse d'un ancêtre commun a pu être envisagée.

Cependant des dissemblances se situent notamment au niveau du caractère de virulence .

La virulence des diverses souches de *T. gondii* a été étudiée chez la souris en déterminant les doses minimales de parasites entraînant la mort de 50% ou de 100% des animaux (DL50 et DL100). Une souche est considérée comme virulente lorsqu'un seul tachyzoïte introduit par voie intra-péritonéale, entraîne la mort de l'animal en moins de 10 jours (DL100 =1) (17).

Le génotype I est très virulent pour la souris mais il est rarement isolé chez l'Homme. La souche RH est la plus représentative de ce génotype (historiquement isolée d'un patient VIH présentant une toxoplasmose cérébrale). Les tachyzoïtes se multiplient rapidement et peu se transforment en bradyzoïtes chez la souris engendrant un nombre très faible voir nul de kystes intratissulaires. Cette souche est dite «non kystogène». La capacité de migration et de transmigration des tachyzoïtes de cette souche à travers les barrières biologiques *ex vivo* est supérieure à celle des tachyzoïtes des souches de types II et III.

Les souches du génotype II, moins virulentes, sont les plus fréquemment isolées lors d'infections humaines en France (plus de 80 % des souches).

Quant au génotype III, les souches sont principalement rencontrées chez les animaux et de virulence intermédiaire (11).

Cependant en plus de ces trois types majoritaires, il existe des génotypes dits « atypiques » dont certains très virulents circulent en Amérique du Sud, et notamment en Guyane, à l'origine de toxoplasmoses acquises sévères (à forme oculaire et pulmonaire). Le typage génétique de ces souches a révélé une grande diversité génétique (18). La possibilité de réinfection par une souche atypique est une autre conséquence de cette diversité génétique. L'immunité contre une souche pourrait ne pas protéger complètement contre une autre, comme cela a été décrit dans la littérature avec des cas de réinfection par une souche atypique conduisant à une toxoplasmose congénitale sévère (19).

PARTIE 2 :

Réponse immunitaire au cours de la toxoplasmose

1. Invasion

Toxoplasma gondii, parasite intracellulaire, envahit la cellule hôte de façon active en utilisant un mouvement de glissement dépendant de sa mobilité. Ce mode d'invasion est alimenté par l'action du cytosquelette actine-myosine du parasite. Pour envahir la cellule hôte, le parasite sécrète de façon séquentielle des protéines notamment des adhésines. Dès le contact initial du pôle apical avec la surface de la cellule-hôte le contenu des micronèmes est libéré. Immédiatement après, les rhoptries déversent leur contenu dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Les protéines de rhoptries interviennent ensuite dans la biogenèse de la vacuole parasitophore (VP) (Figure 6).

Les protéines déchargées à la surface du parasite établissent des interactions fortes et spécifiques avec les récepteurs de la cellule hôte. Ces complexes forment alors une jonction mobile. Pendant l'invasion, les complexes protéines-récepteurs sont déplacés vers l'extrémité postérieure du parasite sous l'action de la myosine et en conséquence, le parasite est propulsé dans la cellule hôte. Le parasite utilise la membrane cytoplasmique de la cellule hôte pour former un nouveau compartiment : la vacuole parasitophore. Cette dernière permet le transport des nutriments essentiels de la cellule hôte au parasite, tout en prévenant la fusion lysosomale, ce qui conduirait à la destruction du parasite.

Immédiatement après l'invasion, le parasite déclenche, au sein de la vacuole parasitophore, un programme de division cellulaire - l'endodyogénie - , processus au cours duquel deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère (20)(21).

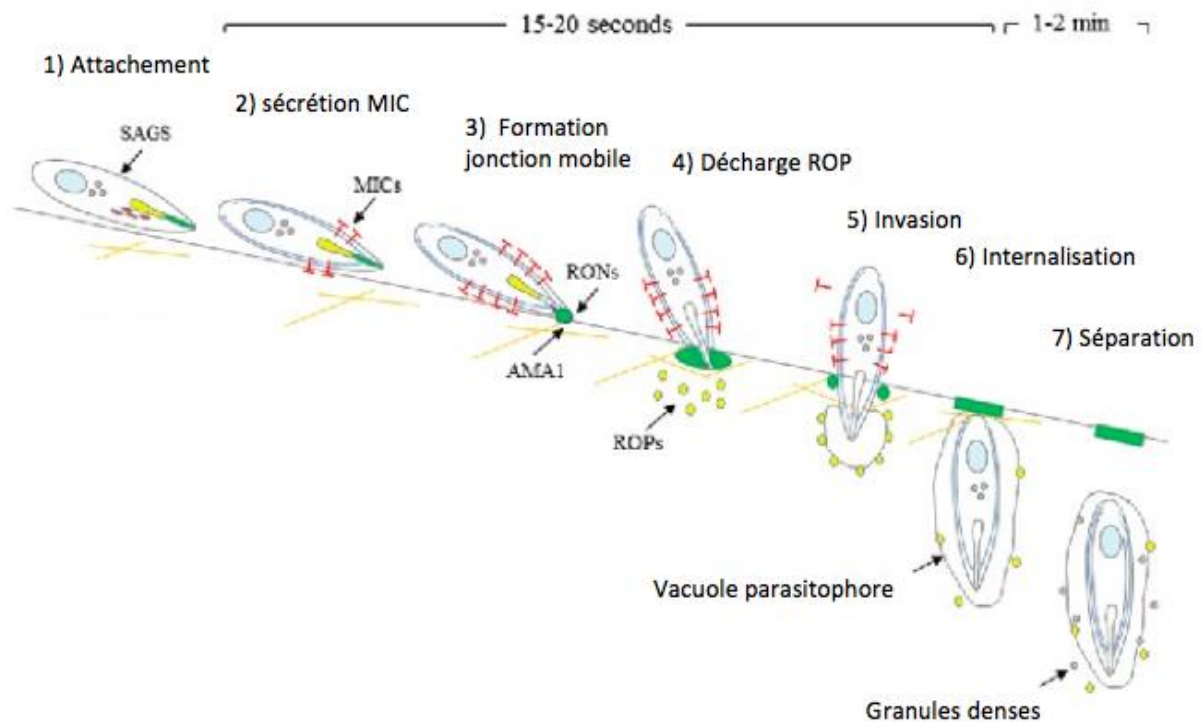


Figure 6: Invasion d'une cellule hôte par *Toxoplasma gondii*(22)

SAGs: antigène de surface ; MIC: micronème ; ROP: protéine de rhoptries ; RONS: protéine du col des rhoptries ; AMA1: Antigène apical membranaire1

2. Mise en place de l'immunité innée

Après ingestion de viande crue ou insuffisamment cuite, les kystes tissulaires viables se rompent lors du passage dans le tube digestif, provoquant la libération de bradyzoïtes. Les bradyzoïtes infectent l'épithélium intestinal de l'Homme et se différencient en tachyzoïtes.

Dans le cas d'une contamination par de l'eau ou d'aliments contenant des oocystes sporulés, les sporozoïtes libérés pénètrent dans l'épithélium intestinal, et se différencient en tachyzoïtes. Les tachyzoïtes résultant de la transformation soit des bradyzoïtes soit des sporozoïtes se répliquent rapidement par endodyogénie à l'intérieur de tout type de cellule et disséminent dans tout l'organisme.

Cette entrée déclenche dans un premier temps une activation non spécifique avec production d'oxyde nitrique (NO) et de chimiokines. Ces substances entraînent sur le site d'infection le recrutement des macrophages (MO), des monocytes inflammatoires (Mn), des lymphocytes natural killers (NK), des cellules dendritiques (CD) et des polynucléaires neutrophiles (PNN)(23) (24).

Les cellules épithéliales intestinales secrètent également de l'interleukine 15 (IL-15) et de l'interleukine 18 (IL-18), nécessaires à l'activation des NK.

Le rôle principal de la réponse immunitaire innée contre *T. gondii* est de détecter l'agent pathogène et de produire l'interleukine -12 (IL-12) (Figure 9). En effet cette cytokine produite par les PNN, les Mn/ MO et les CD, oriente précocement la réponse immunitaire spécifique vers un profil Th1 caractérisé par une production de TNF- α (Tumor Necrosis factor alpha), d'IFN- γ (interféron gamma) et par une réponse effectrice à médiation cellulaire (25).

Dans le modèle murin, les souris déplétées Knock Out en IL-12 ou en IFN- γ infectées par *T. gondii* succombent à une maladie aiguë et montrent une incapacité à contrôler la charge parasitaire (26)(27).

2.1 Cellules de l'immunité innée

2.1.1 Les cellules dendritiques (CD)

Les CD représentent la source essentielle de l'IL-12. Elles jouent un rôle central, via leur production d'IL-12, dans l'évolution vers une réponse adaptative de type Th1 et la production d'IFN- γ .

2.1.2 Les monocytes / macrophages (Mn/MO)

Les macrophages sont les cellules impliquées dans le processus de la phagocytose. L'interaction entre les MO et les antigènes parasitaires provoque la production de TNF- α qui avec l'IFN- γ produit par les NK et les lymphocytes T, induit une production massive de molécules toxiques et réactives comme les radicaux libres de l'oxygène (RLO) et du nitrogène (RNI), molécules qui permettent de détruire les parasites.

En réponse aux antigènes solubles de *T. gondii*, les MO produisent de l'IL-1 qui a une action synergique avec l'IL-12 pour favoriser la production d'IFN- γ à partir de cellules de la réponse innée et adaptative (28).

2.1.3 Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

Les PNN contiennent de l'IL-12 pré-stockée et sont donc rapidement actifs sur le site de l'infection (29). Ils sécrètent aussi des chimiokines (CCL3 et CCL4) qui attirent les CD

immatures, les MO et les lymphocytes T. Les PNN aident à la maturation des cellules dendritiques immatures, via leur activation par le TNF- α .

2.1.4 Les cellules natural Killer (NK)

Les cellules NK produisent de l'IFN- γ sous l'action de l'IL-12 sécrétée par les cellules de l'immunité innée (CD, MN, PNN).

L'activité des cellules NK atteint un pic au début de l'infection à *T. gondii*, et semble moins significative durant le stade d'infection chronique. Les cellules NK humaines peuvent également être cytotoxiques pour les cellules infectées par *T. gondii* (30).

2.2 Synthèse IFN- γ

L'IFN- γ est le principal médiateur de la résistance à *T. gondii*, responsable de multiples mécanismes intracellulaires capables de tuer le parasite et d'inhiber sa réplication. Cette cytokine est synthétisée par les cellules NK et les lymphocytes T. Sa production est essentiellement sous la dépendance de l'IL12. Dans une étude, les souris ayant reçu un anticorps monoclonal bloquant l'IFN- γ meurent d'une infection aiguë (27).

L'IFN- γ intervient dans la mise en œuvre :

- de l'activité toxoplasmicide des cellules phagocytaires par l'induction de l'expression de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) ,
- dans l'activation des fonctions cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T
- dans l'augmentation de l'expression du CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigène (CPA) jouant ainsi probablement un rôle important dans l'activation des LT CD4+(31).

L'IFN- γ serait impliqué dans le ralentissement de la réplication parasitaire en participant à la transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes, et donc à la transition vers la phase chronique de l'infection (10).

L'IFN- γ limite également la réplication parasitaire notamment dans les fibroblastes et les macrophages en induisant l'expression de l'indolamine 2,3-dioxygénase, enzyme dégradant le tryptophane nécessaire à la croissance de *T. gondii* (24).

2.3 Synthèse TNF- α

Le TNF- α est produit par plusieurs populations cellulaires en réponse aux antigènes de *T. gondii* : les PNN, les CD, les MO, et les LT.

Sa coopération avec l'IL12, stimule la production d'IFN- γ par les cellules NK en phase aiguë(32).

Dans la toxoplasmose, le TNF- α exerce sa fonction protectrice exclusivement via son récepteur TNFR1 présent sur nombreuses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Lors d'une étude portant sur le rôle du TNFR1, des souris déficitaires en ce récepteur succombaient d'une toxoplasmose cérébrale au bout de 17 à 27 jours. L'immunohistochimie de tissus cérébraux et pulmonaires des souris ont démontré une réduction marquée de la production d'iNOS (33).

En effet le principal rôle du TNF- α , en coopération avec l'IFN- γ est d'activer les fonctions toxoplasmicides des macrophages par induction de l'expression d'iNOS.

Malgré ces fonctions effectrices en phase aiguë, le TNF- α ne semble pas indispensable à la neutralisation du parasite. Son rôle apparaît centrale en phase chronique évitant ainsi la réactivation. Par conséquent, la réduction du taux de TNF- α par les médicaments anti-TNF (infliximab, etanercept) conduit à la réactivation de la toxoplasmose latente ainsi qu'à une augmentation du risque de toxoplasmose aiguë. À ce jour dans la littérature, seuls quelques cas de réactivation chez des patients recevant des anti-TNF ont été rapportés. Il s'agissait principalement de toxoplasmoses oculaires et cérébrales, lieux des kystes contenant les bradyzoïtes (34).

3. Mise en place de la réponse adaptative

La réponse immunitaire adaptative se met progressivement en place durant la réponse inflammatoire qui suit la contamination. La résistance à l'infection est associée à une réponse Th1 à médiation cellulaire dont les effecteurs et médiateurs majeurs sont les lymphocytes CD8, CD4 et l'IFN- γ . Le rôle de la réponse immunitaire adaptative est double. Pendant la phase aiguë de l'infection, elle participe au contrôle de la multiplication parasitaire puis induit le passage à la forme chronique par transformation des tachyzoïtes hautement répliatifs en bradyzoïtes peu répliatifs contenus dans les kystes. Pendant la phase chronique de l'infection, l'immunité spécifique maintient les parasites sous forme quiescente et empêche leur réactivation.

3.1 Présentation de l'antigène parasitaire

La réponse immunitaire adaptative nécessite que les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ naïfs rencontrent des cellules qui présentent l'antigène «étranger» par l'intermédiaire respectivement de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité CMH de classe II ou CMH de classe I.

Les cellules LB, les MO et principalement les CD sont considérés comme cellules présentatrices d'antigènes(CPA).

L'antigène à présenter aux LT par les CPA lors de la toxoplasmose résulte de la phagocytose soit de débris parasitaires soit de cellules infectées en apoptose soit du parasite intact (Figure 7A). Une deuxième hypothèse a été émise selon laquelle la vacuole parasitophore présenterait en surface de la CPA un antigène parasitaire (Figure 7B) (35).

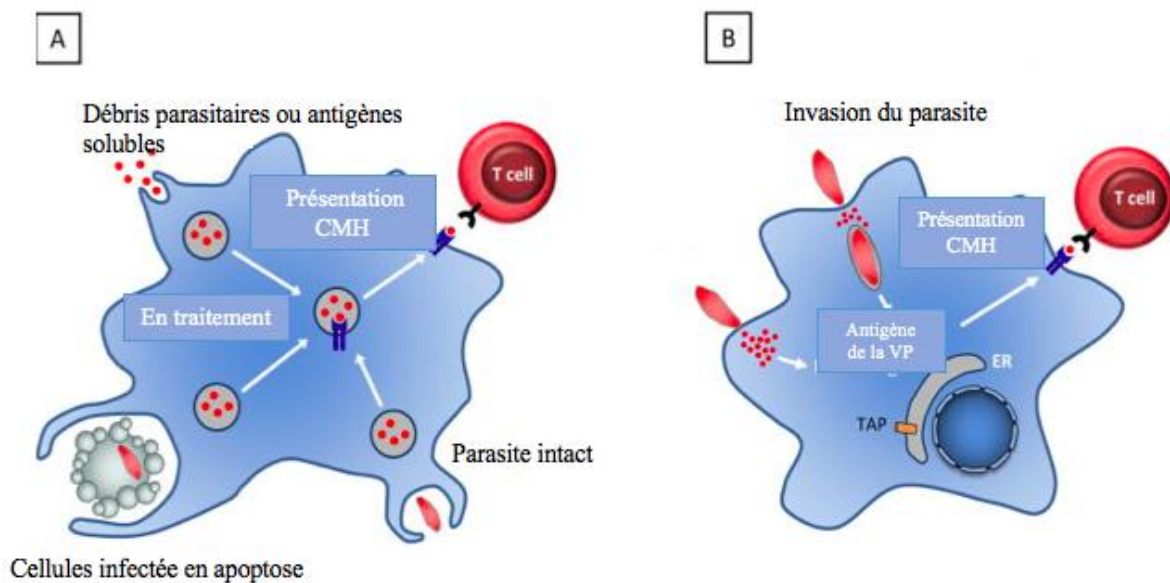


Figure 7: Présentation de l'antigène aux lymphocytes T(35)

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

VP : vacuole parasitophore

3.2 Les lymphocytes CD4⁺

Au cours de la phase aiguë de l'infection à *T. gondii*, les lymphocytes T CD4⁺ ont essentiellement un rôle de production de cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2.

L'IFN- γ et l'IL-2 secrétés par les LT CD4⁺ permettent l'activation des lymphocytes CD8⁺. Des études réalisées chez la souris ont révélé que les LT CD8⁺ étaient les principaux effecteurs de la protection mais que la coopération avec les LT CD4⁺ était indispensable (36). L'absence de lymphocytes CD4⁺ n'induit qu'une réponse partielle des LT CD8⁺. La coopération des lymphocytes CD4⁺/CD8⁺ semble avoir un rôle essentiel dans le maintien d'une immunité cellulaire efficace à long terme.

En effet des études chez le modèle murin, ont montré que la majorité des souris déficientes en CD4⁺ avaient survécu à l'infection précoce à *T. gondii* car l'IFN- γ était produit en grande quantité par les cellules NK. Néanmoins certaines souris avaient succombé plus tardivement. La réponse à long terme des cellules CD8⁺ chez les souris déficientes en CD4⁺ semblait s'affaiblir et n'assurait pas une immunité protectrice face à une nouvelle infection (37)(38).

3.3 Les Lymphocytes T CD8⁺

Les LT CD8⁺ sont les principaux effecteurs de l'immunité anti-toxoplasmique. En effet l'activité effectrice se fait en grande partie grâce à la synthèse importante d'IFN- γ .

Les cellules NK, en association avec les CD, interviennent dans l'induction de l'immunité T CD8⁺. Des travaux visant à bloquer l'un des récepteurs des cellules NK chez des souris infectées ont montré une parasitémie augmentée, une charge kystique cérébrale importante associées à une diminution de la capacité des LT CD8⁺ à proliférer après stimulation antigénique et une baisse de leur production d'IFN- γ (39).

La cytotoxicité des LT CD8⁺ est l'une de leurs principales caractéristiques, bien que cette capacité apparaisse accessoire dans la lutte contre *T. gondii* par rapport à la synthèse d'IFN- γ .

3.4 Les lymphocytes T CD25⁺

Les lymphocytes T régulateurs naturels expriment de manière constitutive l'antigène CD25⁺ (chaîne alpha du récepteur de l'IL-2). Ces cellules ont un pouvoir régulateur, jouant un rôle important dans la toxoplasmose.

Néanmoins lors d'une infection aigue, il a été observé des lymphocytes T surexprimant le CD25⁺: des cellules LT CD4⁺ effectrices (40).

Dans notre étude nous avons donc utilisé l'anticorps CD25⁺ pour marquer les lymphocytes T activés après stimulation antigénique (41). Dans la littérature aucune donnée n'a été rapportée sur les Lymphocytes CD8 CD25⁺.

4. Prévention des phénomènes immuno-pathologiques : réponse Th2 régulatrice

Les effets de la réponse inflammatoire médiée par l'IFN- γ peuvent être délétères pour l'hôte. Afin de prévenir ces effets, une réponse immunitaire de type Th2 anti-inflammatoire est mise en place. Cette réponse implique la sécrétion d'IL-10, IL-4 et de lipoxine A4.

L'IL-10 est produite par les LT Th2, les MO et les cellules NK. Elle joue un rôle immunomodulateur essentiel en régulant négativement la réponse Th1 et en évitant ainsi les phénomènes immunopathologiques liés à une hyperinflammation. Cette activité immunosuppressive s'accompagne d'une diminution de l'activité toxoplasmodicide des macrophages infectés (42)(43).

La lipoxine A4 (LXA4) est un facteur contribuant au contrôle de l'infection pendant la phase chronique.

Cette molécule synthétisée par les macrophages, inhibe la migration des cellules dendritiques, la production d'IL-12 ainsi que l'expression du récepteur intervenant de la sécrétion d'IL-12 : CC-Chemokine Receptor 5 (CCR5)(44).

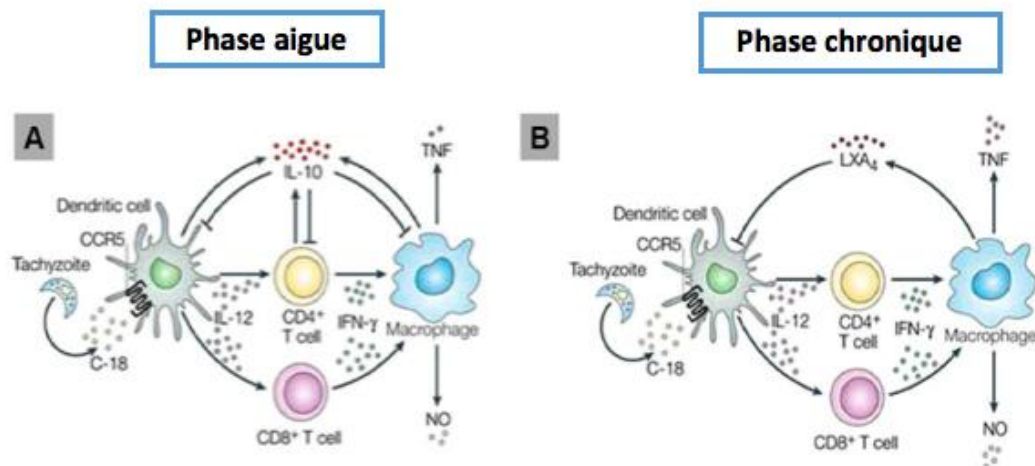


Figure 8: Equilibre entre la réponse protectrice et la réponse régulatrice lors d'une infection à *T. gondii*.

A) lors d'une de phase aiguë, la régulation fait intervenir l'IL-10.

B) Lors de la phase chronique, la LXA₄ est produite et contrôle les réponses induites par les cytokines pro-inflammatoires au niveau des sites où la réplication parasitaire pourrait avoir lieu (système nerveux central)(44).

5. Immunité humorale

L'immunité humorale a un rôle mineur dans le contrôle de l'infection. Les lymphocytes B produisent des anticorps d'isotypes IgM, IgG, IgA et IgE dirigés contre le parasite *T. gondii* selon une cinétique dont nous parlerons dans la partie 3 chapitre 3.2.

Des études *in vitro* ont montré que les anticorps jouent un rôle dans l'opsonisation permettant ainsi aux macrophages de phagocyter les tachyzoites extracellulaires. Ils ont aussi la capacité de bloquer l'invasion du parasite dans les cellules hôtes : ces anticorps spécifiques sont dirigés contre les antigènes de surface SAG 1(P30), SAG 2, SAG 6 (45).

Ils n'ont aucune action sur les formes intracellulaires.

Ils sont essentiellement les témoins indirects d'une infection aiguë et chronique.

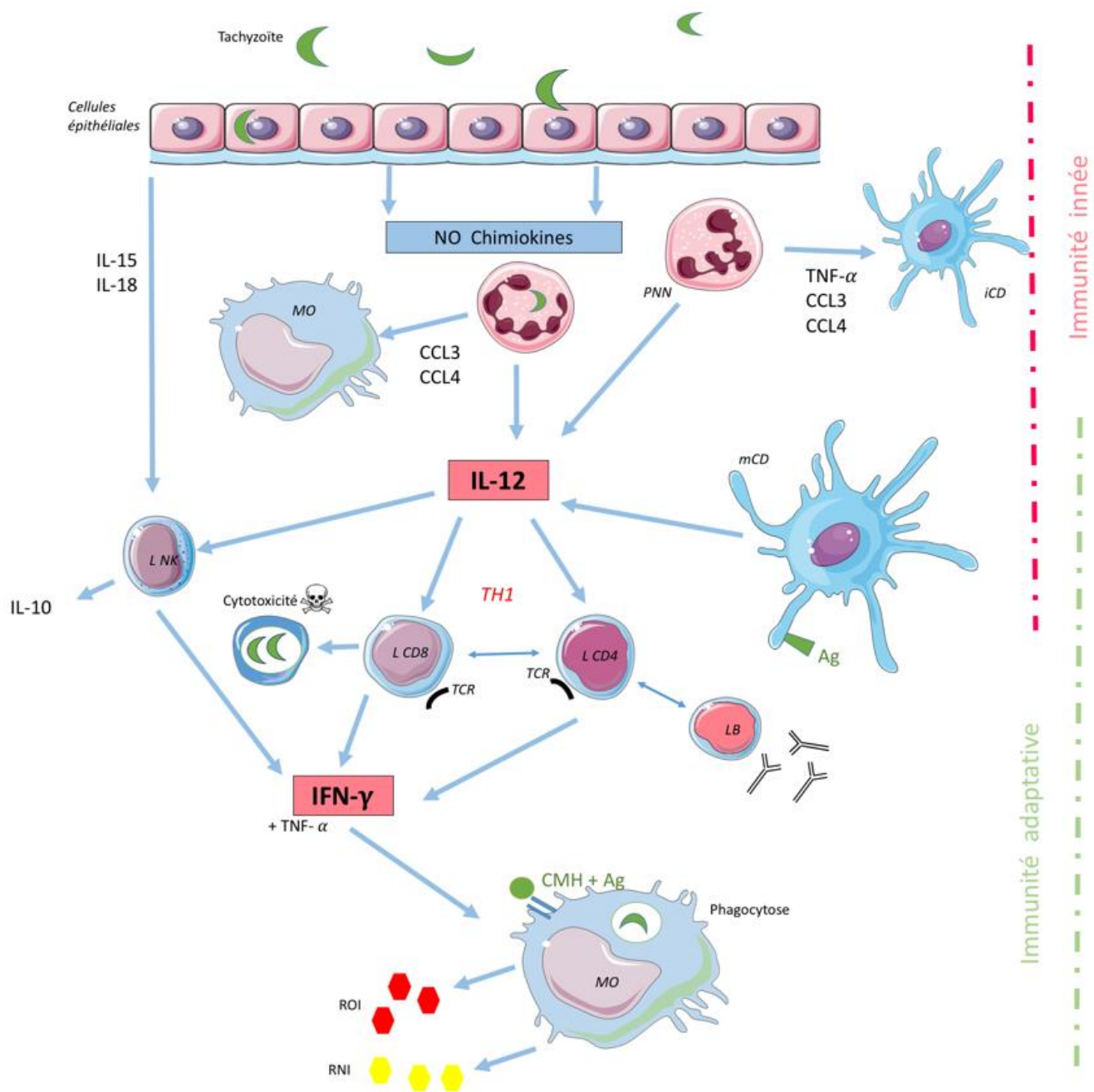


Figure 9: Représentation schématique de la réponse immunitaire contre le *Toxoplasma gondii*

MO: macrophages ; PNN: polynucléaires neutrophiles ; iCD: cellule dendritique immature; mCD: cellule dendritique mature. LB: lymphocyte B; L CD8: lymphocytes T CD8 ; L CD4: Lymphocytes CD4 ;L NK : lymphocytes natural killer ; ROI: reactive oxygen intermediate ; RNI: reactive nitrogen intermediates, TH1: réponse cellulaire de type1.

6. Phase chronique

Le système immunitaire est incapable d'éradiquer *T.gondii*, générant ainsi une infection chronique (10). Le parasite reste ainsi latent dans l'organisme, sous le contrôle de l'IFN- γ et de l'IL-12. Les formes prolifératives, tachyzoïtes échappent au contrôle immunitaire en évoluant vers les formes quiescentes bradyzoïtes, contenues dans des kystes (Figure 10). Un équilibre entre le parasite et l'hôte s'établit.

Il est communément admis que la persistance des kystes stimule continuellement la réponse immunitaire, offrant ainsi une protection à vie contre la réinfection. Dans un article récent de Rougier *et al*, les auteurs remettent en question ce dogme (13). En effet, la persistance de kystes tissulaires de *T. gondii* a été démontrée pendant de longues périodes, mais jamais pendant toute la durée de vie de l'organisme hôte. Remington et Cavanaugh en 1965 avaient isolé des kystes chez des personnes âgées de 50 à 79 ans. Cependant ils n'avaient pas démontré la persistance de ces kystes toute la vie ne sachant pas la date de l'infection (46).

Rougier a constaté, dans une cohorte de 700 patients infectés *in utero*, donc atteints de toxoplasmose congénitale, une diminution et une négativation des titres en IgG, ainsi qu'une négativation de la réponse immunitaire cellulaire au cours du temps.

Dans l'article les auteurs décrivent deux cas de femmes contaminées *in utero* chez qui les taux d'anticorps anti toxoplasmes diminuent plusieurs années après l'infection.

Dans le premier cas, pendant les 19 premières années de vie les anticorps ont regressé progressivement. Au terme de cette période un test d'immunité cellulaire avec mise en évidence de lymphocytes T activés s'est avéré positif (test que nous développerons dans la partie 4 chapitre 2.2.4). 12 ans plus tard et après une grossesse les tests cellulaires (activation des lymphocytes T, dosage de l'IFN- γ) et la sérologie étaient négatifs. Le deuxième cas rapporté présentait une histoire quasi similaire.

Une question se pose alors : «Le déclin des taux d'anticorps signifie-t-il une perte de protection contre une nouvelle réinfection ? ».

La négativation des tests cellulaires aurait pu être expliquée par les changements d'équilibre observés pendant la grossesse dans les réponses immunitaires de type Th1 / Th 2 (voir partie II, chapitre 7). Néanmoins les tests cellulaires et humoraux sont restés négatifs après la grossesse soulevant ainsi la question de la persistance de la protection dans le temps.

Rougier émet une hypothèse selon laquelle la prémunition à vie est le résultat d'une stimulation antigénique fréquente asymptomatique. Les ré-infections permettraient de stimuler efficacement l'immunité adaptative et la mémoire immunitaire. Ce constat a été inspiré de l'infection à plasmodium appartenant aux Apicomplexes. Ce statut immunitaire a bien été caractérisé pour le paludisme : il s'agit d'une immunité protectrice acquise mais non stérilisante qui nécessite le maintien d'infections répétées et disparaît en leur absence. On parle alors de prémunition.

Cette idée doit être étoffée avec des travaux sur le sérotypage permettant d'étudier plusieurs infections chez une même personne au cours de sa vie (13).

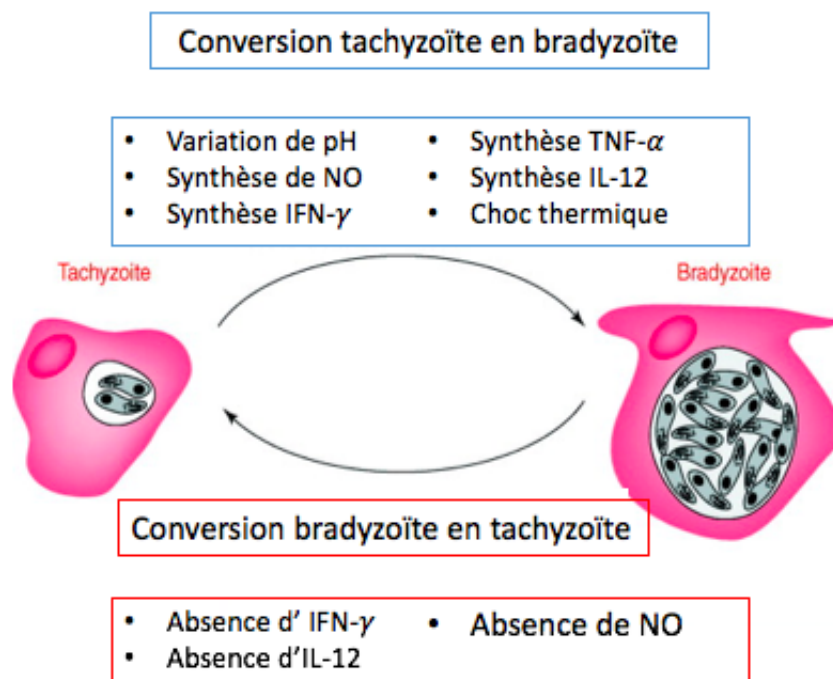


Figure 10: Facteurs associés à l'interconversion tachyzoïte- bradyzoïte(10)

7. Particularités de la réponse immunitaire chez la femme enceinte

L'interaction entre les hormones sexuelles et le système immunitaire est complexe et multifactorielle.

Le système immunitaire sous l'action des hormones, particulièrement la progestérone, s'oriente vers une réponse cellulaire Th2 stimulant ainsi les lymphocytes B avec augmentation de la

production d'anticorps et diminuant la réponse cytotoxique des lymphocytes T. Les taux des cytokines IFN- γ , TNF - α , IL-12 essentielles dans la toxoplasmose régressent tandis que celui de l'IL-10 progresse (47).

Dans le modèle murin les cellules NK et l'IFN- γ jouent un rôle important dans la neutralisation de l'infection maternelle en inhibant la réplication du tachyzoïte. Cependant, il semble que l'IFN- γ améliore, directement ou indirectement, la transmission transplacentaire(48).

Dans une autre étude chez les souris, l'IFN- γ synthétisé à la suite d'une infection à *T. gondii* entraîne des avortements chez des souris gestantes(49).

L'environnement Th2, strictement nécessaire au maintien de la gestation régule négativement la réponse Th1 et augmente la susceptibilité aux microorganismes intracellulaires et donc au *Toxoplasma gondii* (50).

Ces modifications du système immunitaire peuvent expliquer la gravité et la susceptibilité à contracter la toxoplasmose pendant la grossesse.

Il est donc primordial de déterminer de façon fiable le statut sérologique en début de grossesse et d'exercer un suivi si le profil est négatif, au vue de la gravité de cette pathologie chez la femme enceinte.

Nous parlerons ainsi dans cette 3^{ème} partie de la toxoplasmose chez la femme enceinte et plus particulièrement du diagnostic.

Partie 3 : Toxoplasmose et grossesse

1. Données épidémiologiques

En France la séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes ne cesse de diminuer au fil des années. Elle s'explique par une amélioration des mesures d'hygiène alimentaires, individuelles et industrielles, par des modifications du comportement alimentaire chez les Hommes (augmentation de la cuisson des viandes, congélation des aliments) et chez les chats (alimentation industrialisée de type croquettes).

Une disparité régionale en France est à noter :

- Faible prévalence dans l'Est à climat hivernal et dans les régions montagneuses
- Forte prévalence dans les régions humides du Nord et dans le Sud Ouest.

La séroprévalence en France était de 84 % en 1960, 44 % en 2003 et 37 % en 2010 (51).

Cette régression de la séroprévalence entraîne une augmentation du nombre de femmes enceintes séronégatives nécessitant un suivi sérologique mensuel et génère par conséquent un coût supplémentaire. L'HAS et l'INVS demandent au Centre National de Référence de la Toxoplasmose des argumentaires afin de justifier la pérennisation de la prise en charge de la femme enceintes en France concernant la Toxoplasmose congénitale.

2. Transmission materno-fœtale : toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale résulte de la transmission par voie transplacentaire de *Toxoplasma gondii* au fœtus lorsqu'une mère séronégative se contamine pour la première fois pendant la grossesse.

Il existe également un risque de développer une toxoplasmose congénitale, lorsque les femmes s'infectent dans le mois qui précède la grossesse (infection périconceptionnelle).

L'infection du fœtus implique la contamination préalable du placenta ; la situation inverse ne se vérifiant pas : la contamination du placenta n'induit pas nécessairement l'atteinte du fœtus. Il peut agir comme une véritable barrière biologique.

Les risques de transmission materno-fœtale s'avèrent d'autant plus importants que l'âge gestationnel du moment où la mère est infectée, est élevé. En effet, le risque de transmission de l'infection au fœtus est estimé globalement à 30 %, mais il varie de 5% au cours du premier trimestre grossesse à plus de 70 % durant les dernières semaines de grossesses (52). A l'inverse, l'atteinte du fœtus apparaît d'autant plus sévère que son infection s'est produite tôt pendant la grossesse.

Des avortements spontanés, des morts fœtales *in utero* peuvent être constatés lorsque la séroconversion se produit en début de grossesse. Entre 8 et 20 semaines d'aménorrhées, des formes graves telles que hydrocéphalie, calcification intracrânienne, convulsions et hépatosplénomégalie ont été rapportées. Le risque de chorioretinite persiste pendant toute la grossesse.

Dans la majorité des toxoplasmoses congénitales les nouveaux nés sont cliniquement asymptomatiques à la naissance, le diagnostic étant uniquement biologique. Le traitement précoce par pyriméthamine/sulfadoxine ou pyriméthamine/sulfadiazine limite une possible évolution secondaire vers une forme oculaire ou neurologique retardée. Ces nouveau-nés restent néanmoins exposés à un risque de présenter des séquelles dans leur vie future (53).

D'après le rapport d'activité du CNR toxoplasmose 2017, la prévalence globale de la toxoplasmose congénitale en France est de 2,5 pour 10 000 naissances. Le taux des formes graves à la naissance est estimé à 1,2% des cas de toxoplasmoses congénitales (54).

3. Diagnostic sérologique

La mise en évidence d'anticorps spécifiques contre le *T. gondii* chez la femme enceinte a deux applications. D'une part elle a pour but de déterminer le statut immunitaire et d'assurer une surveillance sérologique en cas de séronégativité. D'autre part elle permet de dépister d'éventuelles séroconversions au cours de la grossesse. Dans ce dernier cas, la datation de la contamination s'avère essentielle pour apprécier le risque de toxoplasmose congénitale.

3.1 Réglementation

La France face à la gravité et à la fréquence des toxoplasmoses congénitales a mis en place un

programme de prévention dès 1978. Ce programme recommandait la réalisation d'un dépistage sérologique systématique lors de l'examen prénuptial. Ce dernier ayant été supprimé il est désormais systématique de réaliser le dépistage sérologique dès l'annonce de la grossesse.

La circulaire n°605 du 27 septembre 1983 recommande d'informer les femmes enceintes non immunisées des moyens de prévention (Annexe 1). En 1992 un décret impose la surveillance sérologique mensuelle des femmes enceintes séronégatives de la déclaration de grossesse à l'accouchement.

La législation impose de réaliser le titrage d'au moins deux isotypes d'immunoglobulines (IgG et IgM) par au moins deux techniques différentes.

Pour confirmer le statut sérologique une seconde sérologie doit être effectuée avec les mêmes techniques et dans le même laboratoire. En cas de titre limite, ou de suspicion d'une infection récente, il est obligatoire de pratiquer des techniques complémentaires de confirmation.

Le laboratoire doit mentionner sur son compte-rendu les techniques utilisées avec les valeurs seuils et le résultat doit être accompagné d'une conclusion argumentée avec interprétation du profil sérologique et des modalités du suivi. Il a également l'obligation de conserver à -20°C tous les sérums analysés pendant au moins 1 an.

3.2 Cinétique des anticorps au cours d'une primo-infection

Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître, généralement une semaine après l'infection et atteignent un plateau en l'espace d'un mois (Figure 11) (11). Une lente diminution se produit ensuite généralement au cours des 9 mois suivants jusqu'à la négativation. Ainsi chez certains patients, les IgM se négativent très rapidement alors que chez d'autres ils peuvent persister plusieurs années après l'infection. Cette situation peut conduire à des difficultés d'interprétation.

Les IgA surviennent dans le premier mois de l'infection avec une cinétique comparable à celle des IgM mais avec une négativation plus rapide entre 3 et 6 mois. Les IgA se révèlent de bons marqueurs d'infection récente, les anticorps naturels de type IgA n'existant pas. Néanmoins l'absence de synthèse d'IgA dans 5% des infections aiguës limite leur utilisation.

Concernant les IgG, la cinétique varie en fonction de la protéine parasitaire qu'elles reconnaissent. Les IgG de spécificité anti-membranaire apparaissent plus précocement, environ

2 semaines après la contamination et augmentent rapidement pour atteindre leur maximum à 2 mois. Elles sont détectées par des techniques utilisant des antigènes de surface ou figurés. Les IgG de spécificité anti-cytoplasmiques sont détectées plus tardivement vers 1 mois par des méthodes immunoenzymatiques ou chimiluminescentes utilisant un mélange d'antigènes solubles et membranaires. Par conséquent la précocité de la détection des IgG spécifiques dépend de la technique utilisée. Une proportion plus importante en antigènes membranaires permet une détection plus rapide des anticorps.

Quelle que soit la technique utilisée, les IgG atteignent un plateau en 2 ou 3 mois, puis décroissent plus ou moins rapidement et persistent à des titres résiduels très variables selon les patients.

Les taux résiduels en IgG sont le témoin d'une infection ancienne et chez la femme enceinte le témoin d'une immunité protectrice pour son enfant.

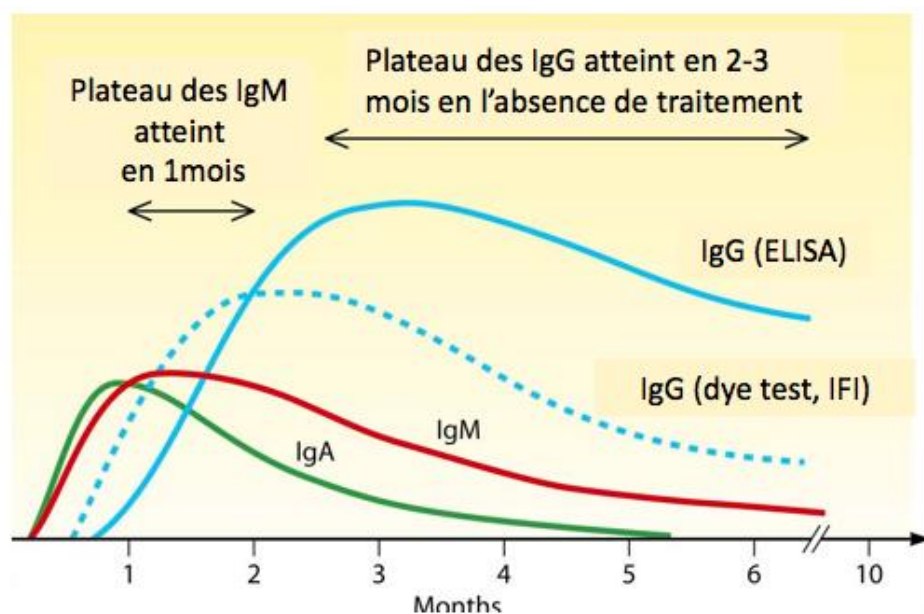


Figure 11: Cinétique des anticorps lors d'une primo-infection contre le *Toxoplasma gondii*(11)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay ; IFI: Immunofluorescence indirecte ; Ig:Immunoglobuline

3.3 Techniques sérologiques de détection des IgG

Dans une démarche de diagnostic, deux groupes de techniques peuvent être distingués :

- les techniques de première intention, ou de dépistage :

Ces techniques automatisées sont les plus utilisées en routine : elles font appel à l'agglutination, l'immunofluorescence ou des techniques immunoenzymatiques

- les techniques de deuxième intention, ou complémentaires réalisées par des laboratoires experts lorsque les résultats obtenus par les tests de dépistage soulèvent un problème d'interprétation. Par exemple le Western Blot IgG II® (WB) permet de confirmer la positivité d'IgG à de faibles titres dont nous parlerons ultérieurement.

Les techniques de dosage utilisent deux sortes d'antigènes :

- les antigènes figurés composés d'antigènes membranaires : tachyzoïtes entiers, vivants ou fixés,
- les antigènes solubles : extraits de tachyzoïtes, vivants inactivés ou recombinants, composés d'un mélange d'antigènes cytoplasmiques et d'antigènes membranaires.

Parmi les antigènes membranaires, l'antigène SAG-1 ou P30 (protéine de 30 kiloDalton (kDa)), spécifique du *T. gondii* correspond à la protéine de surface la plus immunogène.

3.3.1 Techniques de dépistage

Les « techniques immunoenzymatiques » (EIA) regroupent l'ensemble des techniques qui reposent sur un dosage enzymatique de type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), et sur un dosage immunologique par chimiluminescence sans étape enzymatique de type ECLIA (Electro Chemiluminescence Immuno Assay), CLIA (ChemiLuminescence Immuno Assay), CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay). Ces techniques sont les plus utilisées par les laboratoires de routine en tant que test de dépistage automatisé et rapide. Sur le marché plusieurs systèmes sont disponibles pour le dosage des IgG anti toxoplasmes:

- Architect Toxo IgG® (Abbott) : **technique utilisée dans la partie expérimentale**
- Vidas IgG® (Biomerieux) : **technique utilisée dans la partie expérimentale**
- Elecsys Toxo IgG® (Roche Diagnostics)
- Diasorin® (Liaison)
- Acces toxo IgG®, DXI toxo IgG® (Beckman Coulter)
- Advia centaur®, immulite toxo IgG® (Siemens)...

Ces différents tests commerciaux ne permettent pas de rendre des résultats standardisés en raison des variations de qualité d'antigènes d'un réactif à un autre. Le titre des IgG exprimé en UI/ml ne fait pas référence à une gamme étalon universelle.

De plus la sensibilité des dosages varie selon les réactifs et s'avère difficilement fiable dans la détection des IgG à titres faibles. La plupart des fournisseurs ont défini une zone grise ou équivoque pouvant correspondre à ces cas de taux faible d'IgG.

Dans la littérature ces systèmes sont comparés à une méthode de référence dite «gold standard» le Dye-test pour calculer des sensibilités relatives ou plus récemment le Western blot IgGII.

Ainsi l'Architect® a une sensibilité supérieure au Vidas IgG II® dans les infections aiguës pour détecter les IgG précoces et à faible titre. A l'inverse dans les infections anciennes Vidas IgG II® a une meilleure sensibilité par rapport à l'Architect® (55).

3.3.2 Technique de confirmation

Le Dye Test, méthode de référence pour confirmer les résultats discordants et douteux, constitue une technique onéreuse et complexe qui tend à disparaître. Elle n'est pas réalisable en routine.

Le WB LDBIO toxo II® quant à lui a fait ses preuves comme test de confirmation. En effet comparé au Dye Test, ce test a une sensibilité très élevée de 99,2 %.

Cette technique automatisable, peut être pratiquée dans des laboratoires non spécialisés.

Le WB est caractérisé par cinq bandes visibles spécifiques de l'infection à *Toxoplasma gondii* entre 30 et 45 kDa : 30, 31, 33, 40 et 45. La présence de 3 bandes parmi les 5 incluant la bande à 30kDa (SAG 1) permet de confirmer l'existence d'anticorps anti toxoplasmes (figure 12)(56).

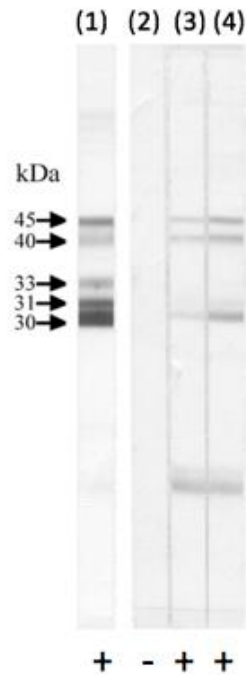


Figure 12: Western blot LDBIO toxo II®(56)

KDa : kilodalton ; - : Western Blot négatif ;+ : Western Blot positif

3.4 Interprétation des sérologies de dépistage à titres faibles d'IgG

Chez la femme enceinte, déterminer le statut immunitaire s'avère primordial. Ainsi Le profil IgG équivoque /IgM négative ne permet pas de conclure sur le profil sérologique. Il peut correspondre à une immunité ancienne : dans ce cas la femme enceinte ne bénéficiera pas d'un suivi mensuel. Dans le cas contraire une surveillance sérologique et des mesures hygiéno-diététiques devront être mises en place (Annexe1).

En pratique face à un profil avec des IgG équivoques, il est recommandé de réaliser une deuxième technique de confirmation des IgG de méthode différente.

- Si la deuxième technique est négative, on considèrera le profil de la femme enceinte négatif.
- Si la deuxième technique est positive, il s'agit probablement d'une immunité ancienne à confirmer dans 3 semaines sur un nouveau sérum.
- Si la deuxième test est douteux, il est fortement conseillé de réaliser un Dye test ou le Western Blot IgG (57).

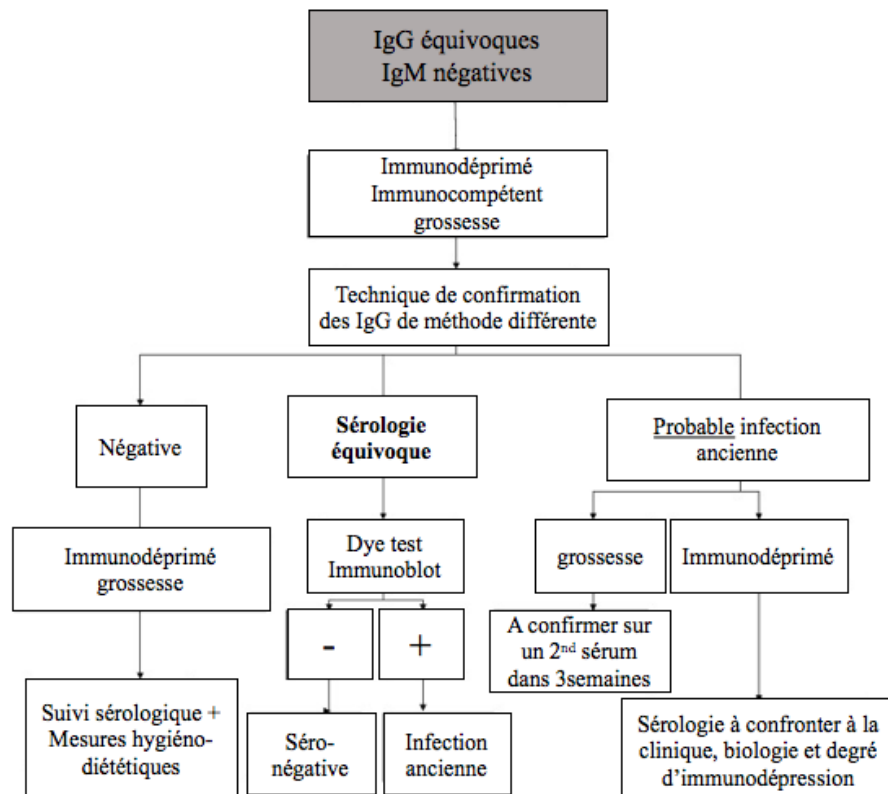


Figure 13: Algorithme décisionnel devant une sérologie IgG équivoques/ IgM négatives(57)

PARTIE 4 : Etude de la corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire dans la toxoplasmose humaine

Objectif de l'étude :

L'existence d'un profil sérologique douteux en IgG (discordance entre deux techniques ou IgG équivoques) chez la femme enceinte est une situation assez courante. L'interprétation définitive de la sérologie demande la réalisation d'un western blot IgGII, technique sensible et spécifique, détectant des titres d'IgG très faibles.

Au laboratoire de parasitologie de l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée, nous avons constaté un nombre élevé de Western blot toxo IgGII® (LD-Bio Diagnostics) réalisés en tant que test de confirmation (voir chapitre 4.1). Pour toutes demandes de sérologie toxoplasmose, au laboratoire il est réalisé deux tests de dépistage :

- 1) une sérologie IgG sur architect® (Abbott) qui est une technique CMIA
- 2) un test d'agglutination indirecte Toxo-HAI FUMOZ®. En présence d'anticorps spécifiques dans le sérum, les particules sensibilisées avec des antigènes de *T. gondii* s'agglutinent macroscopiquement.

Si une discordance entre les deux tests apparaît ou si les concentrations en IgG sur Architect® sont équivoques, le Western blot toxo IgGII® est effectué.

Le problème soulevé est alors de savoir si les femmes enceintes présentant un taux faible d'anticorps sont protégées face à une nouvelle infection. Les anticorps ont un rôle mineur dans la défense contre le *T. gondii*. La sérologie ou le titre des IgG reflète-il l'efficacité d'une réponse immunitaire cellulaire contre le parasite ? Existe-t-il une corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire chez l'Homme en ce qui concerne l'infection à *Toxoplasma gondii* ?

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié chez des sujets volontaires sains présentant des titres d'anticorps IgG différents, la réponse immunitaire cellulaire *in vitro* après stimulation des cellules lymphocytaires par des antigènes de *T. gondii*.

Le dosage de l'IFN- γ et du TNF- α par méthode ELISA et l'étude de l'activation des lymphocytes CD4⁺ par cytométrie en flux ont permis d'étudier cette réponse cellulaire. Les résultats obtenus ont été comparés à la sérologie respective de chaque sujet réalisée sur Architect[®] (Abbott), VIDAS IgGII[®] (BioMérieux) et par Western blot IgGII[®] (LD-Bio Diagnostics).

1. Matériels

1.1 Population étudiée

Cette étude a été réalisée à partir de 25 sujets volontaires sains âgés de 26 à 60 ans, ne présentant ni grossesse ni infection aiguë telle que la grippe pouvant interférer avec l'activation des lymphocytes CD4⁺. La cohorte est composée de 19 femmes et de 6 hommes.

Deux tubes de sang ont été prélevés et transférés à l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée infection :

- Le premier tube sec gélosé Vacutainer (BD Diagnostics) utilisé pour la sérologie IgG Architect[®](Abbott) , IgG Vidas[®] (BioMérieux) et pour le Western Blot LDBIO TOXO II IgG[®] (LD-BIO Diagnostics)
- Le deuxième tube Vacutainer (BD Diagnostics) contenant un anticoagulant l'héparine de lithium afin de réaliser une culture cellulaire sur sang total. Le sang est rapidement (moins de 24 heures) mis en contact avec l'antigène *T. gondii* dans le but de doser l'IFN- γ , le TNF- α et de détecter les lymphocytes T CD4⁺ activés en cytométrie en flux.

Un consentement signé pour chaque volontaire a été recueilli.

1.2 Réactif : Antigènes de *Toxoplasma gondii*

Les antigènes de *T. gondii* ont été préparés à partir d'ascites de souris OF1 infectées par la souche RH-I (génotype I). Les tachyzoïtes de *T. gondii* récupérés dans la poche d'ascite de 10 souris sont tout d'abord lysés dans du Tampon SDS (dodécylsulfate de sodium) puis 4 cycles de congélation / décongélation et sonication par ultrasons ont finalisé la lyse. Après centrifugation à 4°C 3500 tours/min pendant 10 minutes, le surnageant contenant les protéines du Toxoplasme (membranaires et cytoplasmiques) a été filtré à travers une membrane (pores de 0,2 μ m) pour obtenir une solution antigénique. La concentration finale de cette solution a été mesurée par photométrie à 562 nm après réaction au Cu(II) et révélation à l'acide bicinchoninique (méthode dite au BCA) (Protein Quantification kit, Interchim). Nous avons utilisé une solution mère d'antigène *T. gondii* RH à 12mg/ml de protéines.

2. Méthodes

2.1 Tests mettant en évidence la réponse humorale

Après centrifugation du tube sec à 3000 tours/min pendant 15 min, le sérum de chaque sujet volontaire est analysé sur automate Architect[®] selon les recommandations du fournisseur. Les

IgM ont été dosées sur Architect® : seuls les sujets ayant des IgM négatives ont été retenus. Le dosage des IgG basé sur la technique CMIA possède une zone grise pour des concentrations comprises entre 1,6 et 2,9 UI/mL. Le test est positif pour des concentrations supérieures ou égales à 3 UI/mL et négatif pour des concentrations inférieures à 1,6 UI/mL. Nous avons complété le profil sérologique avec la technique Vidas Toxo IgG II® (BioMérieux) plus sensible dans les infections anciennes. Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique en sandwich en deux étapes à une détection finale en fluorescence ELFA (Enzyme linked fluorescent Assay). Les concentrations IgG comprises entre 4 UI/mL et 7 UI/mL, sont considérées comme équivoques.

La technique de confirmation repose sur le western blot LDBIO-Toxo II IgG® (LDBio, Lyon, France). Selon la notice du fournisseur seulement 35 µL de sérum sont nécessaires pour effectuer le test. La présence de 3 bandes parmi les 5 incluant la bande à 30kDa (SAG 1) suffit à confirmer l'existence d'anticorps anti-toxoplasmiques.

Les volontaires de la cohorte ont été ainsi classés en 3 groupes en fonction de leur profil sérologique obtenu sur l'Architect® IgG complété par le WB IgGII (Tableau 1) :

Tableau 1: Répartition de la cohorte

N° du groupe	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Type de profil	négatif	douteux	positif
Caractéristiques	IgG négative sur Architect® + WB négatif	IgG équivoque sur Architect® + WB positif ou IgG négative Architect® + WB positif	IgG positive sur Architect® + WB positif

2.2 Tests mettant en évidence la réponse cellulaire

A partir de l'échantillon de sang total prélevé sur tube hépariné et pour chaque sujet, deux types de cultures ont été réalisées (Figure 14) :

- une culture cellulaire en microplaque de 96 puits fonds plats stériles Cellstar® pour le dosage de l'IFN- γ et du TNF- α après 24 heures
- une culture cellulaire en tube Falcon® 75X12mm en polyéthylène stérile avec bouchon pour une durée de 7 jours afin de déterminer le taux des lymphocytes CD4⁺ activés par cytométrie en flux.

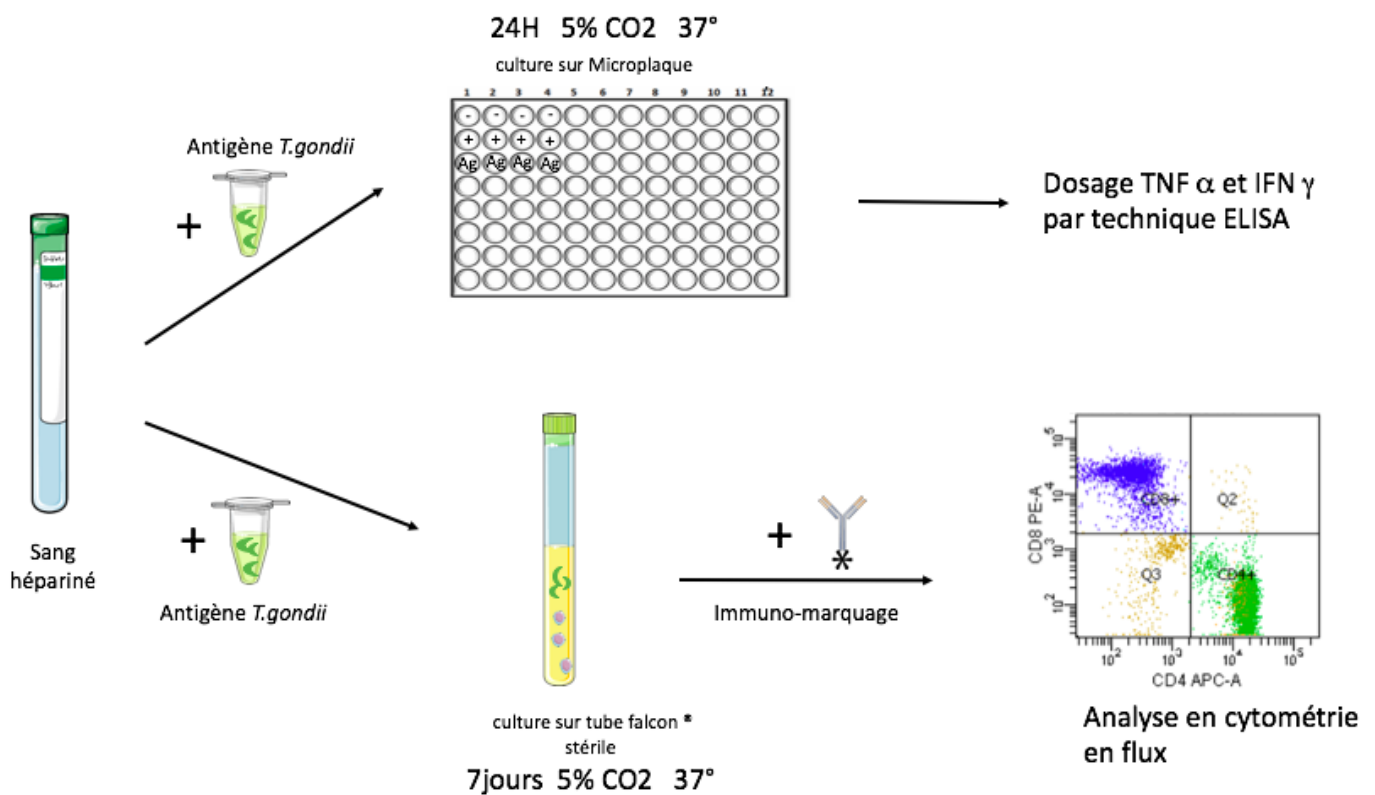


Figure 14: Protocole de l'étude

Ag: antigène, - : témoin négatif, +: témoin positif

2.2.1 Culture et activation

2.2.1.1 Culture cellulaire en microplaque stérile Cellstar®

Pour chaque sujet, le plan de plaque a été le suivant : 4 puits correspondant à la réaction entre les cellules lymphocytaires et l'antigène toxoplasmique, 4 puits correspondant au témoin positif d'activation des LT, et 4 puits correspondant au témoin négatif (12 puits au total).

Pour les puits correspondant à la réaction entre les LT du sujet et l'antigène toxoplasmique : 150 µL de sang total hépariné ont été mélangés à 150 µL de RPMI Medium 1640 Gibco® dans lequel l'antigène toxoplasmique avait été préalablement dilué au 1/1000^{ème} (concentration finale = 6 µg/mL).

Pour les puits correspondant au témoin positif : 20 µL de phytohéماغglutinine (PHA) Gibco® à 1-2% v/v ont été rajoutés au mélange RPMI Medium 1640 Gibco® (130µl) et au sang total hépariné (150µl). La PHA gibco® s'avère être un puissant agent mitogène capable d'activer de manière non spécifique les lymphocytes T.

Pour les puits correspondant au contrôle négatif : 150µl de solution de RPMI ont été ajoutés à 150 µL de sang total hépariné.

Toutes les plaques de cultures ont été incubées pendant 24 heures à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Les surnageants de culture ont été recueillis après centrifugation à 1600 g pendant 15 minutes à température ambiante et conservés à -40 °C jusqu'à la réalisation des dosages d'IFN-γ et de TNF-α.

2.2.1.2 Culture cellulaire sur tube Falcon®

Les cultures ont été réalisées sur tube Falcon® 75X12mm en polyéthylène stérile avec bouchon. 50 µL de sang total hépariné ont été mélangé à 50 µL de RPMI medium 1640 Gibco et de solution d'antigène *Toxoplasma gondii* afin d'obtenir deux concentrations finales différentes: 12 µg/mL (dilution 1) et 6 µg/mL (dilution 2). Pour le témoin positif nous avons utilisé de la PHA gibco® (1-2 % v/v): 10µl dans 40 µl de RPMI medium 1640 Gibco et 50µl de sang total hépariné.

Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 7 jours dans une étuve à atmosphère humidifiée (5% de CO₂). La culture a été supplée par 500 µL de RPMI medium 1640 Gibco® chaque jour afin d'apporter des éléments nutritifs et réduire la toxicité.

2.2.2 Dosage de l' IFN-γ

La concentration de l'IFN-γ dans le surnageant cellulaire après stimulation antigénique (ou par le PHA) des LT a été déterminée à l'aide du kit commercial Human IFN-γ Elisa Kit II ®, BD

OptEIA selon les recommandations du fournisseur. Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique de type ELISA sandwich avec lecture de la réaction finale des densités optiques à 450 nm (contre 620 nm). Les concentrations sont déterminées grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'une concentration mère d'IFN- γ à 300ng/L (figure 15). Chaque échantillon de surnageant a été déposé en duplicata.

Les résultats sont exprimés en ng/L.

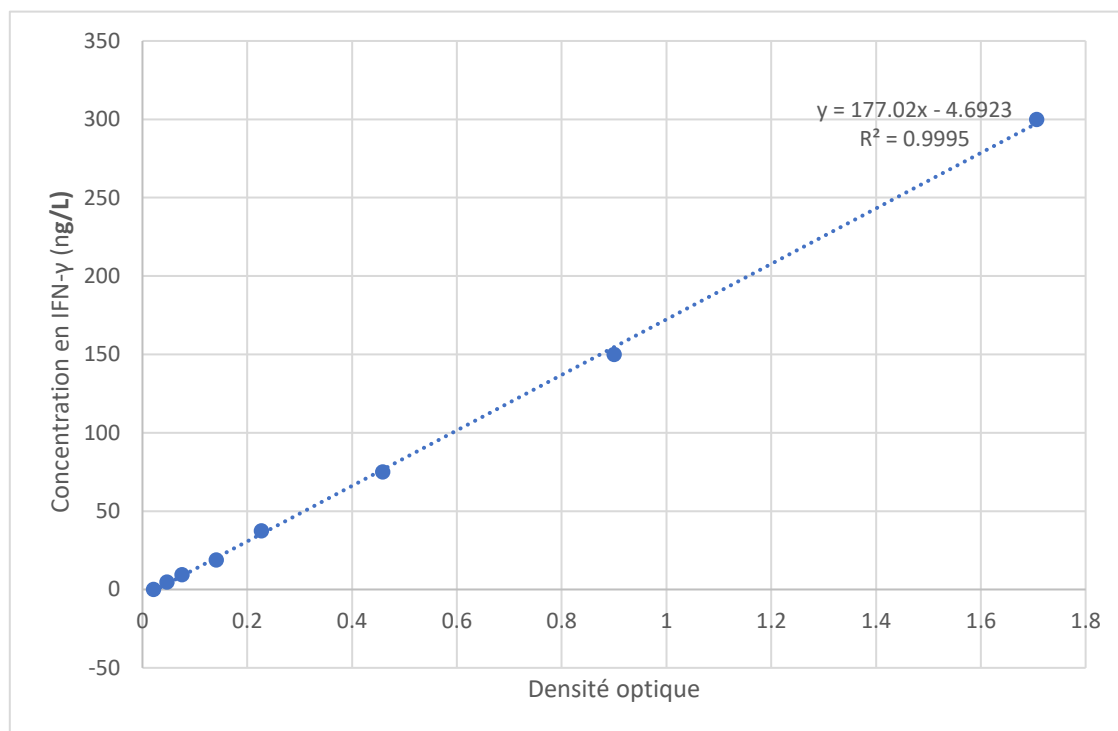


Figure 15: Courbe d'étalonnage dans le dosage de l'IFN- γ par technique ELISA

2.2.3 Dosage du TNF- α

Concernant le dosage du TNF- α , nous avons utilisé le kit de R&D system[®] : Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit DTA00 selon la notice du fournisseur.

Les concentrations en TNF- α des surnageants cellulaires après activation antigénique ou non spécifique (PHA) des LT ont été déterminées par une technique ELISA de type sandwich. Les densités optiques à 450nm (contre 620 nm) d'une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère de TNF- α à 10 μ g/L ont permis d'obtenir les concentrations des surnageants cellulaires en TNF- α (Figure 16).

Les résultats sont exprimés en ng/L.

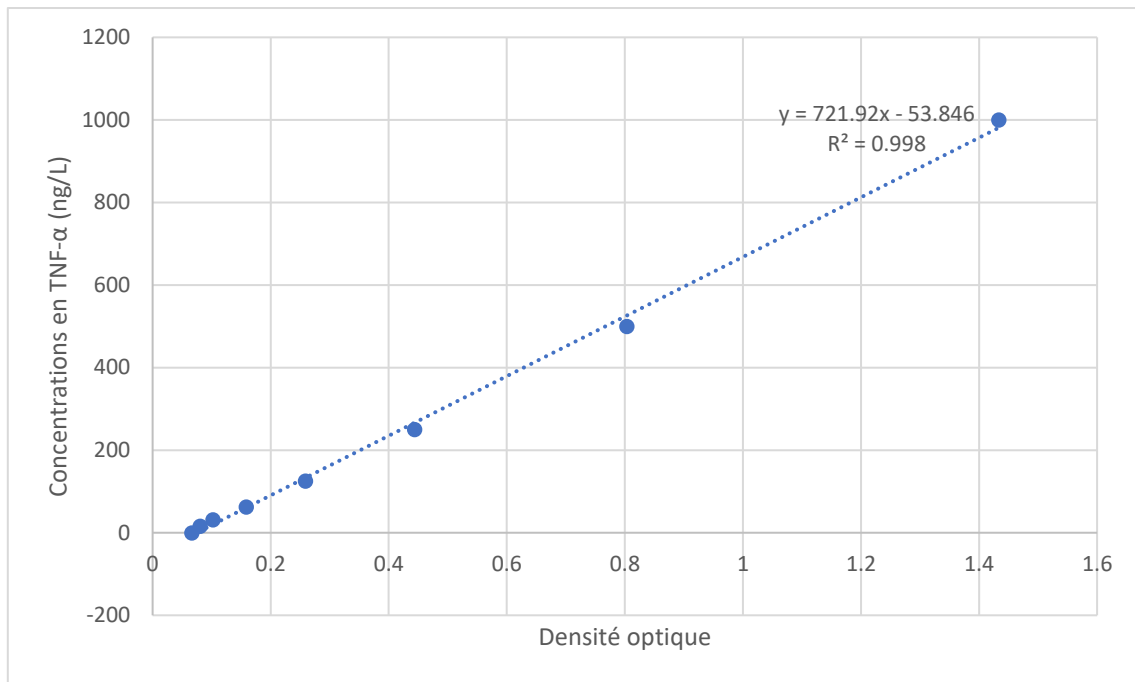


Figure 16: Courbe d'étalonnage dans le dosage du TNF- α par technique ELISA

2.2.4 Marquage des lymphocytes T CD25+ en cytométrie en flux

Pour mettre en évidence les lymphocytes T CD4 et CD8, nous avons utilisé 7 μ L d'un mélange d'anticorps commercialisé CD3/CD8/CD45/CD4 BD multitestTM (BD, Becton, Dickinson and company). Les lymphocytes activés sont quant à eux marqués par 7 μ L d'anticorps CD25 PE-Cy7 (BD). Ces différents anticorps sont couplés à des fluorochromes (Tableau 2).

Après 7 jours de culture en tube falcon à 37°C, la suspension cellulaire est centrifugée (1000g pendant 5minutes).

La totalité du culot cellulaire est incubée pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité avec les anticorps CD3/CD8/CD45/CD4 et CD25 PE-Cy7 (BD).

Les globules rouges sont ensuite lysés par 2 mL de tampon de lyse (BD facsTM lysing solution 10X à diluer dans de l'eau distillée) pendant 10 minutes dans l'obscurité. Après centrifugation à 300g pendant 5 minutes, les cellules sont lavées par 2 ml du tampon FACS (289 mL de PBS + 11mL de foetal bovine serum gibco[®] +1ml d'EDTA 0,5M ultraPureTM). Une deuxième centrifugation est nécessaire à 200g, 5 minutes. Le surnageant est rejeté puis 200 μ L de tampon FACS sont ajoutés au culot cellulaire. La fluorescence des lymphocytes couplés aux anticorps est quantifiée en utilisant un cytomètre FACS Canto II (Becton-Dickinson) 3 lasers/ 8 couleurs.

Les résultats obtenus sur le logiciel FACS DIVA, sont exprimés en pourcentages de cellules marquées.

Tableau 2: Anticorps utilisés en cytométrie en flux

anticorps	Fluorochromes
CD3	FITC
CD8	PE
CD45	PerCP
CD4	APC
CD25	PE-Cy7

FITC: Fluorescéine Isothiocyanate; PE: Phycoérythrine ; PerCP: Peridinin chlorophyll protein;
APC: Allophycocyanin, PE-Cy7: Phycoérythrine-cyacine7

3. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats du dosage de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'activation des LT a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism version 5. Nous avons testé s'il existait une différence significative entre les 3 groupes de sujets: IgG négative IgG faible et IgG positive franche. Lorsque la répartition était gaussienne, nous avons utilisé le test de Newman-Keuls, et dans le cas contraire le test de Dunn.

Nous avons choisi comme valeur de p pour considérer la différence observée comme statistiquement significative une valeur inférieure à 0.05.

4. Résultats

4.1 Sérologie toxoplasmose à L'IHU

Comme énoncé auparavant, le WB toxo IgGII® est utilisé comme test de confirmation lorsque la sérologie est indéterminée après réalisation des tests de dépistage. Au laboratoire de parasitologie à l'IHU sur l'année 2018 nous constatons que 289 WB toxo IgGII® ont été réalisés sur 13753 demandes de sérologie : soit 2,1 %. Ils ont été effectués pour des titres d'IgG sur Architect® s'étalant de 0,5 à 2,9 UI/mL. La plupart des WB toxo IgGII® se sont avérés positifs (276) : soit 95.5%.

Concernant l'année 2019 (de janvier à juillet), 202 WB toxo IgGII® ont été exécutés sur 7859 sérologies toxoplasmoses (soit 2,5%) pour des titres d'IgG s'étalant de 0,7 à 2,9 UI/mL. Parmi eux, 184 WB toxo IgGII se sont révélés positifs (Figure 17) : soit 91%.

Au total sur 19 mois, 491 sérologies sont indéterminées et 460 correspondent à des sérologies avec des titres d'IgG très faibles : dont 162 avec Architect® IgG négatif.

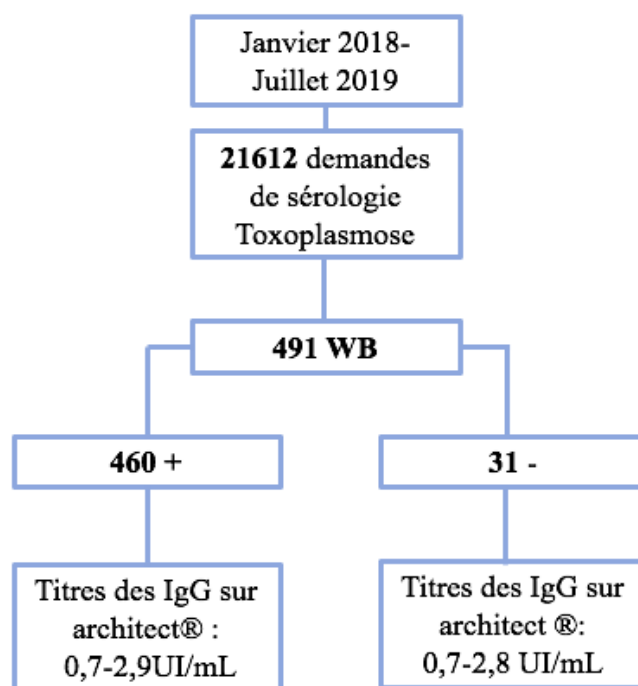


Figure 17: Sérologies réalisées de janvier 2018 à juillet 2019 au laboratoire de parasitologie de l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection

WB : Western Blot toxo IgGII® + : positif ; - : négatif

4.2 Résultats sérologiques

Comme nous l'avons précisé précédemment, la cohorte est répartie en 3 groupes en fonction des résultats de la sérologie (Tableau 3).

Le groupe profil douteux composé de 4 sujets volontaires est caractérisé par soit des IgG équivoques en technique Architect[®] (taux d'IgG entre 1,6 et 2.9 UI/mL) (n=3) soit une discordance entre les techniques de dépistages et le WB positif (sujet n°10).

A noter que pour les patients n° 10, 11, 12 du groupe profil douteux le WB toxo IgGII[®] possédait seulement 3 bandes visibles (P30, P31, P33) ce qui a permis néanmoins de conclure à un test positif. Seul le sujet n°13 du groupe douteux affichait un WB positif à 4 bandes (P30, P31, P33, P40). Dans le groupe profil positif, tous les WB toxo IgGII[®] des volontaires étaient caractérisés par la présence de 4 bandes

Tableau 3: cohorte de 25 volontaires organisée en 3 groupes en fonction de leur profil sérologique.

n° sujet	profil sérologique	Taux IgG VIDAS® (UI/mL)	Taux IgG ARCHITECT ® (UI/mL)	Western blot IgG II
1	Négatif	0	0	-
2		0	0	-
3		0	0	-
4		0	0,1	-
5		0	0,1	-
6		0	0,1	-
7		0	0,1	-
8		0	0,2	-
9		0	0,5	-
10	Douteux	1	1,1	+
11		2	1,6	+
12		2	2	+
13		4	2,9	+
14	Positif	6	3,5	+
15		4	3,7	+
16		10	7,1	+
17		21	8,3	+
18		80	13,1	+
19		38	13,4	+
20		28	18,4	+
21		61	20,8	+
22		113	25,7	+
23		105	28,5	+
24		23	38,7	+
25		70	74,8	+

4.3 Dosage de l'IFN- γ

Les concentrations en IFN- γ des surnageants cellulaires après stimulation antigénique des 25 sujets volontaires sont disponibles dans le Tableau 4. Les 3 groupes indépendants –profil sérologique négatif, douteux et positif –, de répartition gaussienne ont été comparés grâce au test de Newman-Keuls.

Les concentrations en IFN- γ des profils négatifs et positifs sont statistiquement différentes ($p < 0.05$). Dans le groupe profil sérologique positif nous remarquons une importante synthèse d'IFN- γ (moyenne = 405,9 ng/L), contrairement au groupe profil sérologique négatif pour lequel nous observons une faible synthèse d'IFN- γ (moyenne = 17,3 ng/L) (Figure 18).

Concernant les taux d'IFN- γ du groupe douteux, ils sont statistiquement distincts des taux du groupe négatif ($p < 0.05$). En effet nous constatons une production d'IFN- γ chez les sujets volontaires avec des IgG équivoques (sujet n° 10, 11 et 13). Ainsi les concentrations d'IFN- γ du groupe profil sérologique douteux ne diffèrent pas des concentrations en IFN- γ du groupe positif avec des moyennes respectives de 369,6 ng/L et de 405,9 ng/L.

Le sujet volontaire n°10 du groupe douteux pour lequel nous possédons une sérologie négative sur Architect® et Vidas® et un WB IgG II positif présente la concentration la plus élevée en IFN- γ (574,5 UI/mL) de la cohorte (Figure 19). Dans le même groupe, le sujet volontaire n°12 pour lequel nous avons une sérologie équivoque sur Architect®, négative sur Vidas® et un WB IgGII positif a synthétisé très peu d'IFN- γ (27,3 UI/mL), concentrations que nous retrouvons dans le groupe des sujets volontaires non immunisés.

Tableau 4: concentrations en IFN- γ et en TNF- α des surnageants de la culture cellulaire

*: donnée manquante pour le sujet volontaire n°16, résultat non exploitable

n° sujet	profil sérologique	[IFN- γ] en en ng/L	[TNF- α] en en ng/L
1	Négatif	6,1	-37,7
2		1,8	-41,4
3		-6,2	6,8
4		31,5	16,1
5		19,2	9,1
6		31,8	11,3
7		31,8	9,7
8		24	5,9
9		15,7	5,7
10	Douteux	574,5	100,6
11		340,5	429,5
12		27,3	14,8
13		536,2	110,8
14	Positif	452,5	74,8
15		449,9	342,6
16		331,1	*
17		406,0	113,7
18		515,4	363,5
19		340,6	291,6
20		530,6	385,6
21		189,8	104,4
22		568,8	267,4
23		363,5	399,8
24		362,1	422,7
25		360,4	207,8

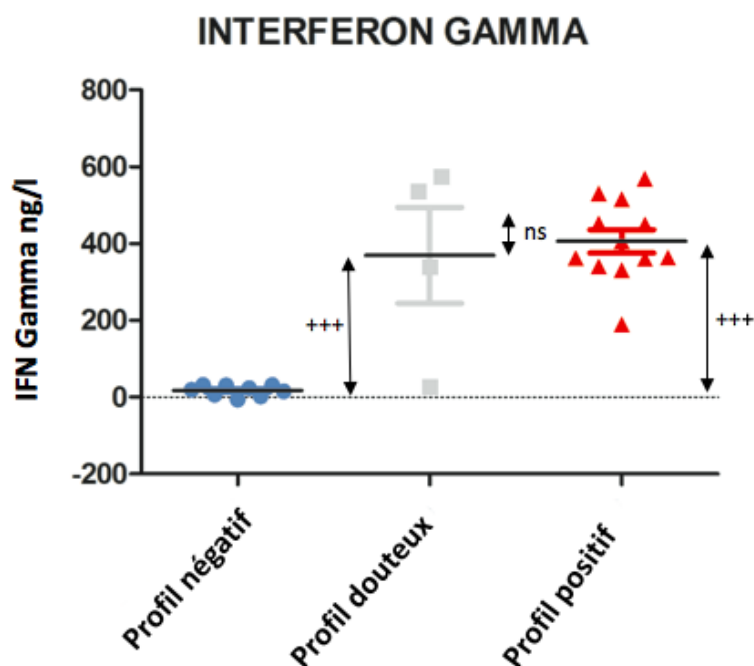


Figure 18: Distribution et comparaison des concentrations en IFN- γ dans les 3 groupes

ns : différence non significative

+++ : quantification de la différence significative entre deux groupes par l'analyse statistique

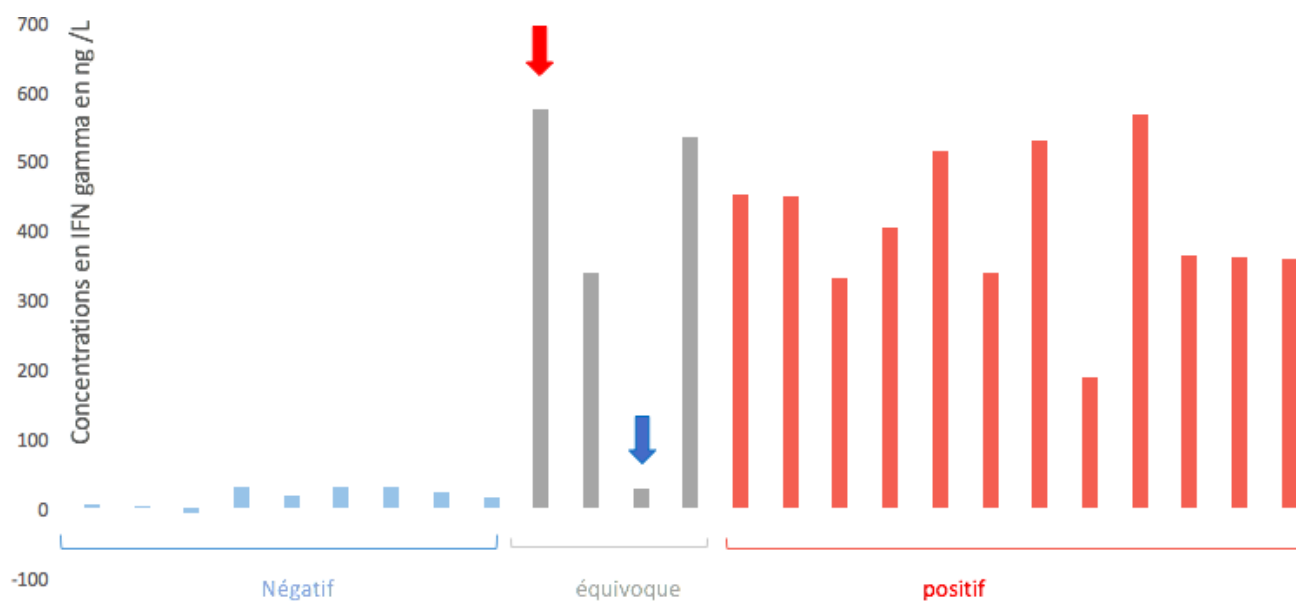


Figure 19: Représentation des concentrations en IFN- γ en fonction du taux IgG sur Architect® des 25 sujets volontaires

La flèche rouge correspond au sujet volontaire n°10, et la flèche bleue au sujet volontaire n°12

4.4 Dosage du TNF- α

Les concentrations en TNF- α des surnageants cellulaires après stimulation antigénique par *T. gondii* des 25 sujets volontaires sont présentés dans le Tableau 4. Le patient n°16 ne possède pas de valeur de concentration en TNF- α , le résultat obtenu s'avérant inexploitable.

Les résultats des 3 groupes indépendants sont de répartition gaussienne, permettant de ce fait l'utilisation du test de Newman-Keuls.

La comparaison des profils positifs et négatifs montre des concentrations en TNF- α statistiquement différentes ($p < 0.05$) (Figure 20). Nous constatons une synthèse de TNF- α chez les personnes immunisées contre la toxoplasmose (groupe profil sérologique positif) avec une moyenne de 270,3 ng/L.

Concernant les volontaires ayant un profil douteux, nous observons également une production de TNF- α après stimulation antigénique (moyenne= 163,9 ng/L). Ce profil se différencie statistiquement de celui des négatifs ($p < 0.05$) (moyenne=-1,6 ng/L) mais ne montre aucune différence statistique avec le groupe des positifs.

Sur la Figure 21, au sein du groupe douteux, nous remarquons que la volontaire n°12 pour lequel nous avons des IgG équivoques sur Architect®, négatives en Vidas, un western blot positif et une faible production d'IFN- γ possède également une faible concentration en TNF- α (14,8 ng/L).

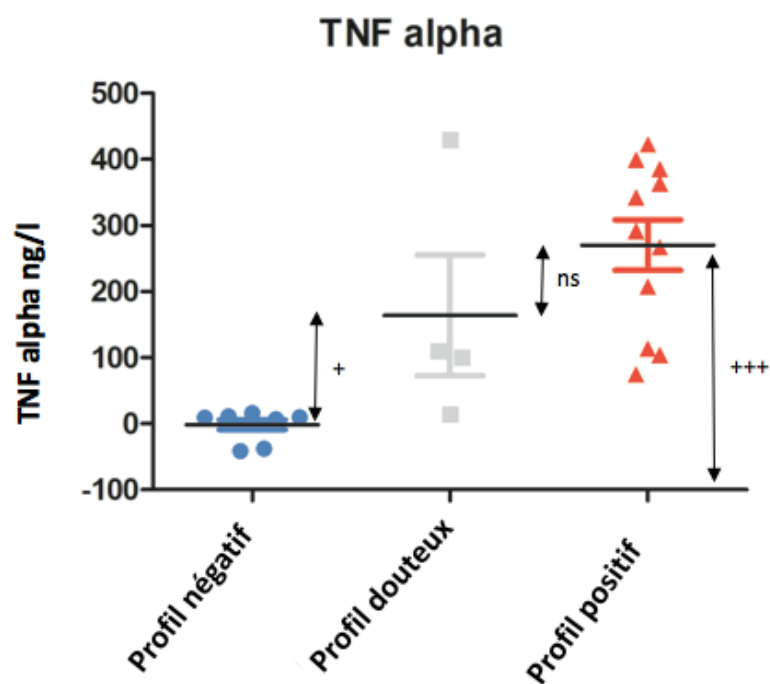


Figure 20: Distribution et comparaison des concentrations en IFN- γ dans les 3 groupes

ns : différence non significative

+++ / + : quantification de la différence significative entre deux groupes par l'analyse

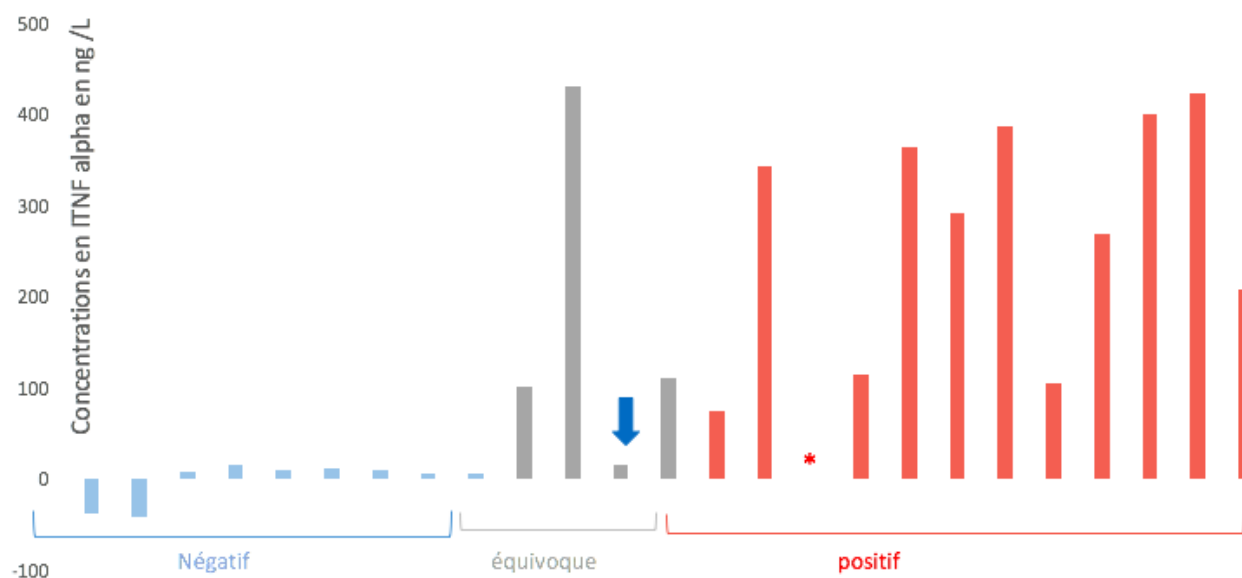


Figure 21: Représentation des concentrations en TNF- α en fonction du taux IgG sur Architect®

*donnée manquante pour le patient n°16

La flèche bleue correspond au sujet volontaire n°12

4.5 Résultats de la cytométrie en flux

Les données obtenues sur FACS DIVA représentent les pourcentages de lymphocytes activés (CD4 CD25+) ou (CD8 CD25+) au sein de la population CD4 ou CD8. Ces cellules sont elles même exprimées en pourcentage par rapport aux lymphocytes CD3 (Figure 22).

Les résultats de la cytométrie en flux sont disponibles en Annexe 2. Le tableau détaillé correspond aux pourcentages de lymphocytes CD4, CD8, (CD4 CD25+), (CD8 CD25+) à l'état basal (témoin négatif), après stimulation non spécifique par la PHA et après stimulation antigénique par *T. gondii* pour chaque sujet volontaire.

Ces résultats montrent un taux de lymphocytes activés (CD4 CD25+) après stimulation antigénique relativement constant, quelque soit la dilution de l'antigène toxoplasmique employée (dilution n°1 ou n°2), pour chaque volontaire.

L'analyse statistique qui suit a été réalisée à partir des résultats obtenus après stimulation antigénique à la concentration de 6 µg/mL (soit à la dilution n°2).

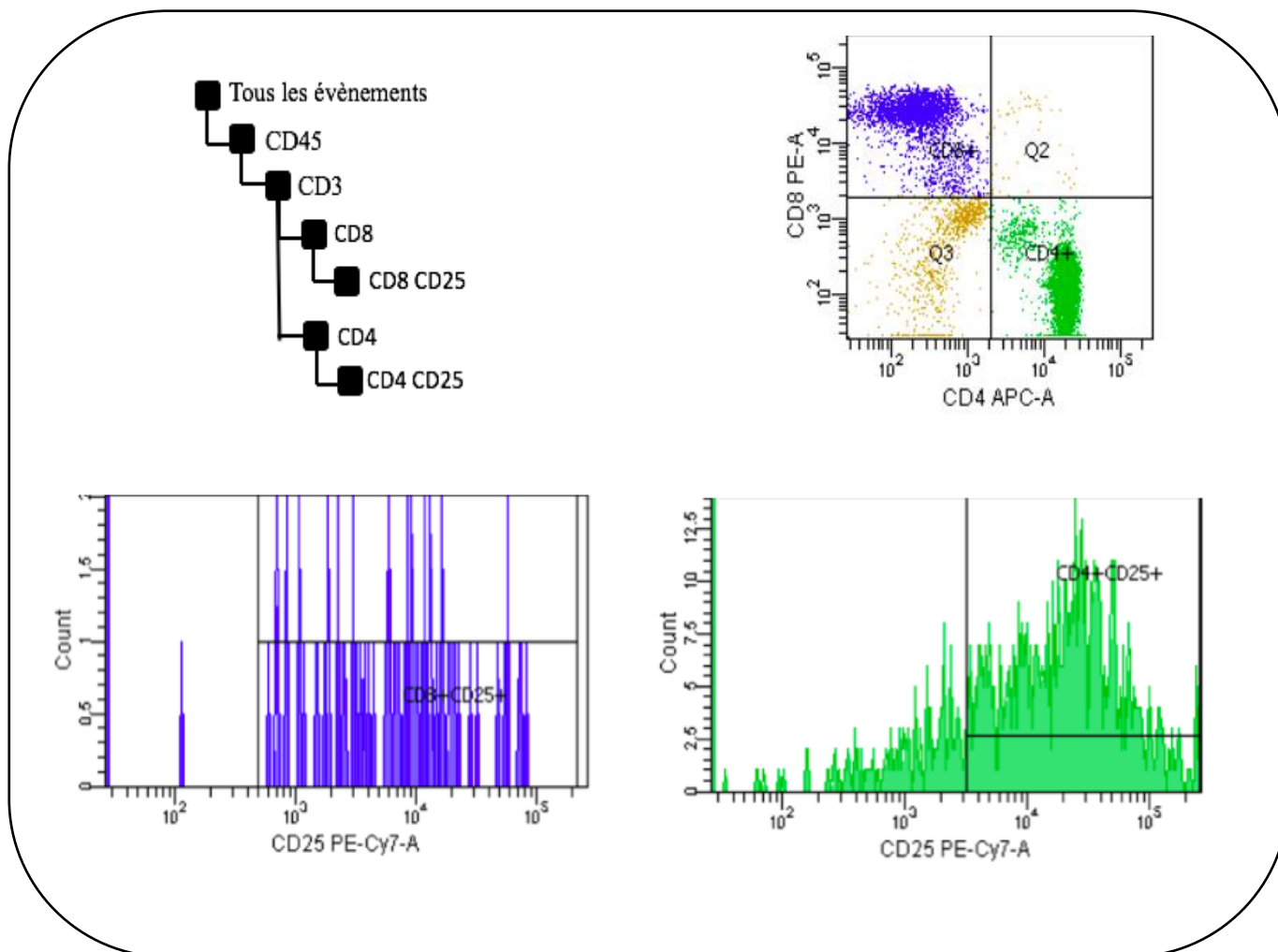


Figure 22: Résultats bruts obtenus sur FACS DIVA

-représentation des différentes populations et sous populations qui ont permis d'obtenir les lymphocytes CD25+

(a)

-les graphiques permettent de différencier les CD4 des CD8 (b), les CD8 CD25+ des CD8 CD25- (c) et les CD4

CD25+ des CD4 CD25- (d)

4.5.1 Comparaison des lymphocytes activés (CD4+ CD25+) des groupes témoin négatif/ témoin positif PHA / sujet après activation par *T.gondii*

Afin d'exploiter les résultats obtenus, nous nous sommes assurés au préalable que les pourcentages de lymphocytes activés (CD4 CD25 +) après stimulation antigénique par *T.gondii* différaient des lymphocytes activés sans stimulation antigénique (témoin négatif) et après activation non spécifique (PHA).

Avec une répartition non gaussienne des résultats, nous avons employé le test de Dunn. Pour une valeur de $p < 0,05$, les lymphocytes CD4 CD25+ des témoins positifs PHA, négatifs, et des sujets après stimulation antigénique étaient significativement différents les uns des autres (Figure 23). Cette constatation nous permet de s'assurer que la technique en cytométrie en flux met en évidence les lymphocytes activés spécifiquement par le *T. gondii*.

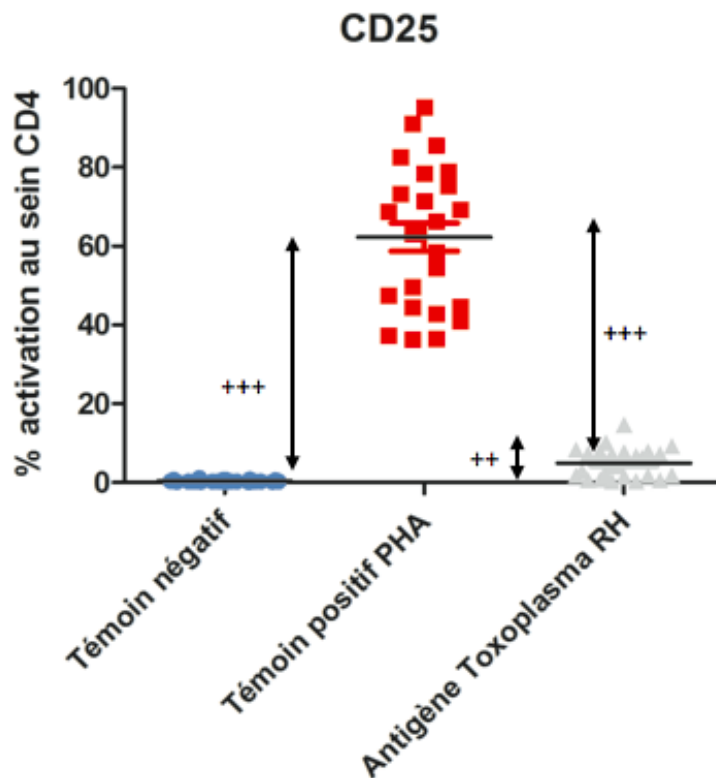


Figure 23: Comparaison des % de lymphocytes activés CD4 CD25+ entre le témoin positif, négatif et après stimulation antigénique

+++ /+ : quantification de la différence significative entre deux groupes par l'analyse statistique

4.5.2 Comparaison des lymphocytes activés (CD4+ CD25 +) des sujets avec un profil négatif / profil douteux/ profil positif

Les résultats des 3 groupes indépendants sont de répartition gaussienne permettant ainsi l'utilisation du test de Newman-Keul (Figure 24). La comparaison des groupes profil négatif et profil positif révèle un taux de lymphocytes activés (CD4 CD25+) significativement supérieur chez les volontaires immunisés (moyenne= 8,1%; intervalle =4,4-14,7% de lymphocytes CD4 CD25+) ($p < 0,05$). Chez les personnes possédant un profil sérologique négatif, les lymphocytes étaient peu réactifs (moyenne = 1,1%; intervalle = 0,25 à 1,9% de lymphocytes CD4 CD25+).

Concernant le groupe profil douteux, il se distingue statistiquement du groupe profil négatif et du groupe profil positif ($p < 0.05$).

Pour la volontaire n° 12 du groupe douteux (pour lequel nous avons un WB positif et une faible synthèse de $\text{TNF-}\alpha$ et d' $\text{IFN-}\gamma$), seulement 1,8 % des lymphocytes CD4 étaient activés. Ce pourcentage correspond à celui retrouvé chez les patients non immunisés.

Chez le patient n°10 pour lequel nous avons une sérologie sur Architect®, et sur Vidas® négative, un WB positif et une synthèse importante d' $\text{IFN-}\gamma$ nous observons un taux de 7,7 % de lymphocytes CD4 CD25+ sans toutefois être le pourcentage le plus élevé..

Le groupe profil douteux semble hétérogène (moyenne= 4,2% ; intervalle = 1,8 à 7,7% de lymphocytes CD4 CD25+) : ainsi nous retrouvons des volontaires avec des pourcentages de LT CD4 CD25+ activés faibles, intermédiaires et élevés mais qui néanmoins diffèrent des 2 autres groupes (négatifs et positifs) d'après l'analyse statistique.

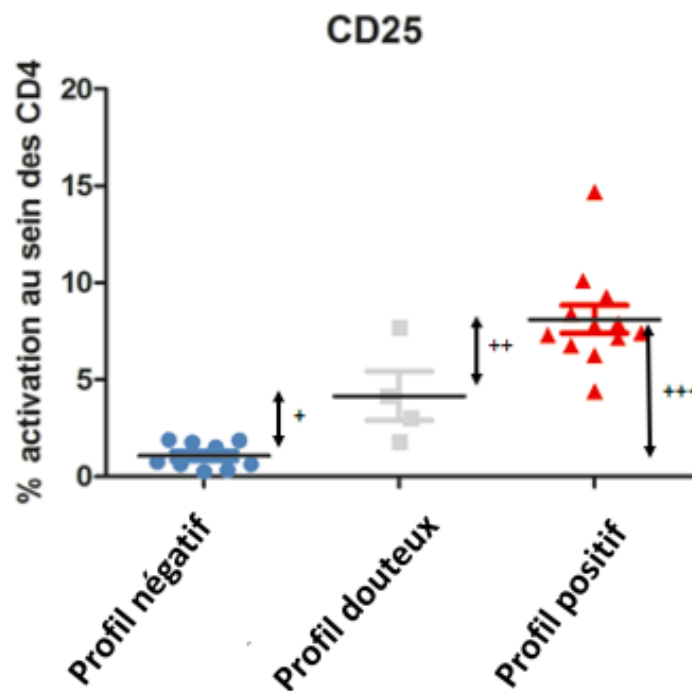


Figure 24: Distribution et comparaison du % de lymphocytes activés CD4 CD25+ dans les 3 groupes

+++ /+ : quantification de la différence significative entre deux groupes par l'analyse statistique

4.5.3 Analyse des lymphocytes CD8⁺ CD25⁺ des groupes témoin négatif / témoin positif PHA / sujets après activation par *T. gondii*

Comme nous l'avons mentionné précédemment, dans la littérature aucune donnée n'a été retrouvée concernant l'expression du CD25 chez les lymphocytes CD8 après stimulation antigénique du *T. gondii*.

Grace à notre fenêtrage sur FACS DIVA, il a été possible d'observer l'expression du CD25 chez les lymphocytes CD8 à l'état basal (témoin négatif), après activation non spécifique (PHA) et après stimulation par l'antigène toxoplasmique. Après activation de la PHA, nous remarquons une surexpression du CD25, qui diffère significativement de l'expression basale. Néanmoins après stimulation antigénique, aucune différence significative n'a été mise en évidence avec le groupe témoin négatif (Figure25).

L'expression du CD25 chez les lymphocytes CD8 n'est pas exploitable, et ne peut donc pas être considérée comme un marqueur d'activation après stimulation toxoplasmique.

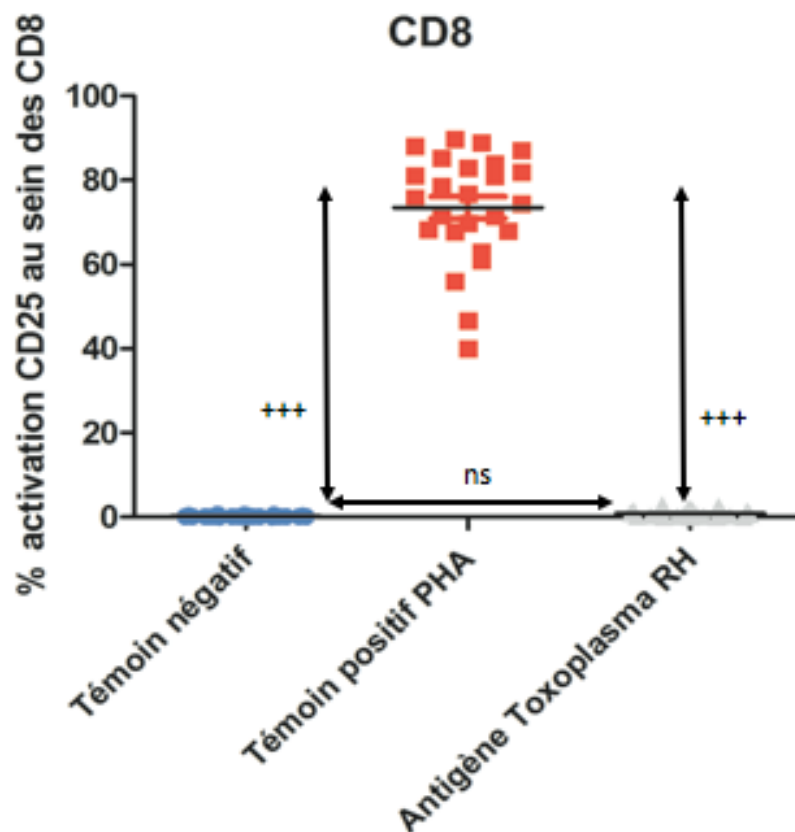


Figure 25: Distribution et comparaison du % de lymphocytes CD8 CD25⁺ dans les 3 groupes

++ /+ : quantification de la différence significative entre deux groupes par l'analyse statistique

Partie 5 : Discussion

La toxoplasmose est une infection parasitaire fréquente causée par *Toxoplasma gondii* suite à la consommation de viande contaminée mal cuite, de crudités mal lavées ou d'eau souillée. Cette parasitose cosmopolite s'avère habituellement bénigne mais sa survenue pendant la grossesse peut engendrer des conséquences parfois graves pour le fœtus. En effet, la toxoplasmose congénitale due à la contamination du fœtus par *T. gondii* à la suite d'une primo-infection maternelle peut être responsable de complications cérébrales, oculaires et viscérales chez l'enfant à naître.

Compte tenu de la gravité des toxoplasmoses congénitales, il est primordial de déterminer de façon fiable le statut immunitaire de la femme enceinte vis-à-vis de *T. gondii*.

Si la présence d'IgG confirme le statut d'une immunité ancienne, la femme enceinte est considérée comme immunisée contre la toxoplasmose. La patiente protège son futur enfant d'une infection dans le cas d'un nouveau contact avec le parasite et ne bénéficiera donc pas d'un suivi mensuel. Si elle est non immunisée, une surveillance sérologique mensuelle et des mesures hygiéno-diététiques devront être mises en place. Certains profils sérologiques sont difficiles à interpréter. Se rencontre entre autre la problématique d'un titre douteux ou faible d'IgG (IgG équivoques en technique EIA confirmés par immunoblot). L'efficacité de cette faible immunisation soulève un doute quant à la protection du fœtus.

Chez d'autres pathogènes des seuils d'immunisation fiables ont été établis. Exemple dans le cadre de l'immunisation contre le virus de l'hépatite B, des titres d'anticorps anti-HBs supérieurs ou égaux à 10 mUI/ml sont considérés comme protecteurs et témoignent d'une mémoire immunitaire solide démontrée *in vivo* et *in vitro* (58). De même pour la rubéole, une sérologie est effectuée avant le début de grossesse pour définir le statut immunitaire. Si la sérologie est négative ou douteuse, une sérovaccination est réalisée (59).

La technique immunoblot ou western blot LDBIO-Toxo II IgG[®] est considérée actuellement comme le gold standard pour déterminer la présence spécifique d'IgG anti toxoplasmes à titres faibles. C'est une technique de confirmation. Le WB permet ainsi d'éviter jusqu'à 2 à 8 % des suivis mensuels inutiles (60).

Face à ces profils sérologiques avec un WB positif mais pour lesquels les techniques EIA n'ont pas été capables de déterminer la présence d'IgG, il est important de savoir si conclure à une immunité ancienne protectrice est justifiée sans mettre en danger l'enfant à naître. En effet la présence d'anticorps sériques n'est qu'un reflet indirect de la réponse anti toxoplasme. La réponse immunitaire efficace contre l'infection à *T. gondii* est majoritairement de type cellulaire ayant comme principaux effecteurs les acteurs suivants : l'IL-12, l'IFN- γ , le TNF- α et les lymphocytes T.

Dans la littérature, certains auteurs ont rapporté des cas de toxoplasmoses congénitales lors de réinfection chez des femmes enceintes immunocompétentes et immunisées contre la toxoplasmose(19). 6 cas de toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiqués: face à 1 d'avortement spontané et face à une symptomatologie bruyante des nouveaux nés (choriorétinite toxoplasmique typique dans 3 cas, toxoplasmoses disséminées dans 2 cas). Certaines manifestations cliniques graves pourraient s'expliquer par une infection par une souche atypique provenant d'Amérique du Sud pendant la grossesse. En effet, ces souches virulentes circulant en Amérique du Sud, sont à l'origine de toxoplasmoses acquises sévères (à forme oculaire et pulmonaire) chez des sujets immunocompétents. Certaines patientes auraient probablement été en contact avec ces souches: consommation de viande de cheval crue importée d'Amérique du Sud, voyage au Brésil pendant leur grossesse, long séjour en Guyane. Ainsi, les femmes enceintes originaires d'Europe qui ont été immunisées contre les souches de type II (souche la plus présente chez les caucasiens) courent un risque de toxoplasmose congénitale si elles se contaminent par des souches atypiques présentes dans les régions tropicales (voyage, consommation de viande). Inversement, les femmes nées en Afrique (un des 6 cas) ou en Amérique du Sud qui sont probablement immunisées avant la conception contre des souches atypiques de *T. gondii* pourraient également être à risque de réinfection par une souche de type II lors de la grossesse.

Néanmoins dans deux cas rapportés, l'origine supposée était un contact avec un chaton en France. L'une d'entre elles possédait des titres d'anticorps à 150 UI/mL et à 223 UI/mL déterminés respectivement par technique d'immunofluorescence indirecte (Toxo-Spot IF; Biomérieux, seuil de positivité : 10 UI/mL) et par dosage immuno-enzymatique (Platelia Toxo IgG; Sanofi, seuil de positivité = 9UI/mL) en début de grossesse. Ainsi la femme enceinte a été considérée comme immunisée et dispensée de suivi. La séroconversion a été mise en évidence rétrospectivement sur des sérums collectés durant la grossesse après diagnostic d'une choriorétinite chez l'enfant de 9 mois. Concernant le deuxième cas, la femme enceinte montrait des taux d'IgG anti toxoplasmes élevés en début de grossesse. Le diagnostic de toxoplasmose

congénitale a été posé à 12 semaines d'aménorrhées lors d'un avortement spontané et d'une augmentation du titre des IgG. Aucune autre cause d'avortement n'a été mise en évidence. Les cas de toxoplasmoses congénitales chez une femme enceinte immunisée et immunocompétente sont exceptionnels, mais montrent que la présence d'anticorps IgG résiduels spécifiques n'est pas toujours synonyme de protection contre une nouvelle infection à *T. gondii* (19).

L'originalité de ce travail a été d'étudier en parallèle la réponse humorale et la réponse cellulaire dans la toxoplasmose humaine. L'étude de la réponse cellulaire a été réalisée *in vitro* après stimulation des lymphocytes T par *T. gondii*. Un dosage des cytokines IFN- γ et TNF- α et une analyse de l'activation des lymphocytes T (CD4 CD25+, CD8 CD25+) ont été effectués. Nous avons choisi de doser les effecteurs principaux de la réponse immunitaire dans la toxoplasmose : l'IFN- γ et le TNF- α afin de mieux apprécier la réponse cellulaire. Le dosage de l'IL-12 n'a pas été réalisé pour des raisons budgétaires et d'accessibilité.

25 sujets volontaires ont été sélectionnés selon leur profil sérologique :

- groupe profil douteux composé de 4 sujets volontaires présentant des IgG équivoques sur Architect[®] ou une discordance entre deux techniques de dépistage
- groupe profil négatif composé de 9 sujets volontaires non immunisés (IgG négatives)
- groupe profil positif composé de 12 sujets volontaires immunisés (IgG positives)

Toutes les sérologies ont été confirmées par immunoblot

Le dosage d'IFN- γ et de TNF- α , principaux médiateurs de résistance de la réponse immunitaire contre le *T. gondii*, a été réalisé après stimulation des cellules lymphocytaires sur sang total par des antigènes *Toxoplasma gondii* (souche RH). Ces antigènes sont issus de l'extraction protéique totale des parasites et comprennent donc les antigènes membranaires et cytoplasmiques. Les résultats montrent que la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α chez les patients appartenant au groupe profil sérologique positif est supérieure à celle observée chez les sujets du groupe profil sérologique négatif. De même, les concentrations en IFN- γ et en TNF- α du groupe profil douteux diffèrent significativement de celles du groupe profil négatif. Au cours de l'histoire naturelle de la toxoplasmose, ces deux médiateurs sont produits par les lymphocytes T circulants chez les sujets immunisés, empêchant ainsi la réactivation des kystes lors de l'infection chronique. Lors d'une stimulation antigénique, les lymphocytes spécifiques déjà présents synthétisent une grande quantité d'IFN- γ et de TNF- α (10).

Ces résultats montrent que lorsque l'immunité humorale est déterminée comme faible, les LT sont tout de même capables de synthétiser significativement les effecteurs efficaces de défenses

contre *T. gondii*. Cependant le niveau de synthèse d'IFN- γ et de TNF- α n'est pas corrélé au titre d'IgG. Exemple, le sujet volontaire n°10 pour lequel la sérologie IgG sur Architect® et sur Vidas® était négative et le WB positif, synthétise un taux élevé de TNF- α (100,6 ng/L) et d'IFN- γ (575 ng/L). A noter que sa concentration en IFN- γ est la plus élevée de la cohorte. Dans le groupe douteux il existe un sujet qui ne répond pas favorablement à la stimulation antigénique. Le sujet n° 12 qui possède des IgG équivoques à 2 mU/L sur Architect® synthétise une très faible quantité d' IFN- γ (27,3 ng/L) et de TNF- α (14,8 ng/L).

Dans la littérature plusieurs articles relatent l'étude de la réponse cellulaire à partir du dosage de l'IFN- γ lorsque le statut sérologique est indéterminé, notamment dans le cadre de toxoplasmose congénitale chez les nouveaux nés (61)(62). Chapey *et al*, ont évalué la performance d'un test de libération à l'IFN- γ sur sang total après stimulation antigénique *in vitro*.(62). Parmi 114 patients adultes immunisés immunocompétents, 5 patients montraient une absence de synthèse d'IFN- γ . Parmi les patients dont la sérologie était négative, 5 sujets avaient des valeurs faiblement positives en IFN- γ . 2 de ces sujets étaient des femmes enceintes traitées par spiramycine et présentées un profil de séroconversion récent et atypique. Le test montrait une sensibilité(Se) de 96% et une spécificité (Sp) de 91% calculées dans cette étude par rapport à la sérologie IgG Siemens® (technique ELISA) complétée par le Dye test pour les échantillons présentant des résultats discordants. La technique Enzygnost de Siemens® s'avère être une technique moins sensible (Se=98,1%) que les techniques utilisées dans notre étude (Se Architect® = 99,1% et Se Vidas® =99,6 % comparées au Dye test) (63). Le test Enzygnost possède une sensibilité diminuée concernant la détection des anticorps IgG dans les infections à toxoplasmes récentes, ce qui pourrait expliquer entre autre la discordance entre sérologie et synthèse d'IFN- γ .

Dans un second temps, nous avons étudié l'activation des lymphocytes CD4+ (CD4 CD25+) par cytométrie en flux après 7 jours de culture *in vitro*. La concentration d'antigènes parasitaires de *T. gondii* et par extension l'inoculum ne modifie pas le taux de lymphocytes activés. En effet pour des concentrations d'antigène *T. gondii* de 12 μ g/mL et de 6 μ g/mL, le taux de lymphocytes activés CD4 CD25+ demeure constant.

Conformément à nos attentes, les sujets du groupe profil positif possédaient des taux de lymphocytes activés (CD4 CD25+) plus élevés que les sujets du groupe profil négatif. Une étude portant sur 590 patients (nouveaux nés et adultes immunocompétents) confirme nos résultats sur les taux d'activation des lymphocytes chez les sujets immunisés. En effet, Fatoohi

et *al*, ont estimé la valeur seuil de 5% de lymphocytes T CD4 CD25+ pour disposer d'un test à Se et Sp maximales (99% et 94 % respectivement) (64). Ainsi dans notre cohorte parmi les 12 sujets du groupe positif, 11 possèdent un taux de lymphocytes T activés (CD4 CD25+) supérieur à 5% et 1 seul un taux de lymphocytes CD4 CD25+ à 4,4 %. Ce dernier (sujet n°15) s'avère cependant apte à synthétiser en grande quantité les cytokines essentielles à la résistance contre la toxoplasmose : l'IFN- γ (449,9 ng/L) et le TNF- α (342,6ng/L). Concernant les sujets non immunisés, leurs taux apparaissent tous inférieurs à 5 % soit 0,4 à 1,9% de lymphocytes activés.

Si nous nous intéressons aux 4 sujets du groupe profil sérologique douteux, nous constatons que 3 volontaires montrent un taux de lymphocytes activés inférieur à 5% (sujet n°11: 3%, sujet n°12: 1,8% et sujet n°13: 4,2 %). Malgré un taux inférieur à 5%, les sujets n°11 et n°13 sont capables de synthétiser de l'IFN- γ (340 ng/L et 536,2 ng/L) et du TNF- α (429,5 ng/L et 110,8 ng/L). Seul le sujet n°12 n'a pas présenté de réponse après stimulation antigénique (IFN- γ =27,3 ng/L, TNF- α =14,8 ng/L).

La volontaire n°10 du groupe douteux, pour lequel la sérologie IgG sur Architect® et sur Vidas® était négative et le WB positif, affiche une réponse cellulaire très marquée. En effet, avec un taux de lymphocytes CD4 CD25+ supérieur à 5% (7,7 %), une synthèse importante d'IFN- γ (575 ng/L) et de TNF- α , (100,6 ng/L) le sujet serait probablement capable de répondre favorablement à une nouvelle infection ou réactivation. Bien que la sérologie de dépistage soit négative, la volontaire présente un statut d'immunité ancienne mis en évidence par le WB. La collecte d'informations sur le profil immunitaire de la volontaire confirme qu'elle a été considérée comme immunisée lors des dépistages au moment de ses grossesses, 10 ans auparavant. Ainsi nous pouvons penser que les titres d'IgG de la volontaire ont diminué au cours des années, et qu'aujourd'hui seul le WB détecte son titre faible d'anticorps.

Pour le sujet n°12 du groupe douteux, les tests cellulaires réalisés se sont avérés négatifs avec des lymphocytes non réactifs (1,8% des lymphocytes CD4 CD25+) et une synthèse d'IFN- γ (27,3 ng/L), et de TNF- α (14,8 ng/L) quasi nulle. Pour ce sujet volontaire, malgré des IgG équivoques, un WB positif, la réponse cellulaire étudiée *in vitro* n'assurerait pas une immunité protectrice contre une nouvelle infection à *T. gondii*. Après enquête nous objectivons également une diminution du titre des anticorps au fil du temps. La volontaire n°12 pour lequel le taux d'IgG en Architect® s'élève à 2 UI/mL (IgG équivoques) a été considérée comme immunisée

lors de ses 2 précédentes grossesses, il y a plus de 14 ans. Les taux d'anticorps positifs décelés lors des grossesses ont permis à la patiente d'éviter un suivi sérologique mensuel, ainsi que la prise de précautions hygiéno-diététiques tout au long de la gestation. Par la suite chez ses enfants aucun problème de santé lié à une potentielle toxoplasmose congénitale n'a été diagnostiqué.

L'analyse des cas n°10 et n°12 a mis en évidence une diminution et une négativation des titres en IgG au cours du temps. Ainsi ces résultats s'accordent avec la remise en question du dogme concernant l'immunité protectrice à vie discuté par Rougier *et al*, (13).

Les auteurs ont également constaté dans une cohorte de 700 patients infectés *in utero*, donc atteints de toxoplasmose congénitale, une diminution des titres en IgG au cours du temps.

Deux cas de femmes contaminées *in utero* chez qui le taux d'anticorps anti toxoplasmes diminuait plusieurs années après l'infection, ont été décrits.

Dans le premier cas, les anticorps anti toxoplasmes de la patiente ont régressé progressivement les 19 premières années de vie . Au terme de cette période, un test d'activation des lymphocytes (CD4 CD25+) après stimulation antigénique parasitaire s'est avéré positif. A l'âge de 31 ans après une grossesse les tests cellulaires (activation des lymphocytes T, dosage de l'IFN- γ) et la sérologie étaient négatifs. Concernant le deuxième cas, la patiente présentait des anticorps positifs jusqu'à l'âge de 18 ans. Deux ans plus tard, lors de sa deuxième grossesse, des tests cellulaires et une sérologie ont été effectués qui se sont avérés négatifs. Cependant les deux grossesses se sont déroulées sans incidents.

La négativation des tests cellulaires aurait pu être expliquée par les changements d'équilibre observés pendant les grossesses dans les réponses immunitaires de type Th1 / Th 2 . Néanmoins les tests cellulaires et humoraux des deux patientes sont restés négatifs après la grossesse soulevant ainsi la question de la persistance de la protection dans le temps.

En effet, la présence de kystes tissulaires de *T. gondii* activant continuellement la réponse immunitaire, a été démontrée pendant de longues périodes, mais jamais pendant toute la durée de vie de l'hôte. L'hypothèse de réinfections fréquentes et asymptomatiques capables de stimuler l'immunité de l'hôte est admise. L'idée d'une stimulation antigénique répétée offrant une immunité protectrice à long terme est née du parallèle que l'on peut établir entre *Toxoplasma* et *Plasmodium* aux niveaux phylogénétique (phylum Apicomplexe) et immunologique. En effet, l'immunité à long terme contre le paludisme et la toxoplasmose dépend des réponses des cellules T mémoire CD8. Pour le paludisme, il s'agit d'une immunité protectrice acquise mais non stérilisante dit prémunition, qui nécessite le maintien d'infections

répétées et disparaît en leur absence. Une absence de stimulation pendant 6 mois entraîne une perte de protection de l'individu contre le Plasmodium. Dans les zones d'endémie du paludisme, la prémunition joue un rôle important dans la réduction de la mortalité en maintenant la charge parasitaire sous un seuil de pouvoir pathogène.

Ainsi une perte de prémunition chez les sujets qui ne sont pas exposés à *T. gondii* après une primo-infection est concevable.

Au terme de notre étude, nous pouvons énoncer que les réponses cellulaires des profils douteux montrent une certaine hétérogénéité. En effet, le niveau de la réponse cellulaire n'est pas corrélé au titre d'anticorps lorsque les taux d'IgG sont faibles. Cependant parmi les 4 sujets du groupe douteux, 3 sujets montrent une réponse cellulaire satisfaisante. Le seuil proposé de 5% de lymphocytes activés de Fatoohi et *al* semble être élevé et pourrait être revu à la baisse. Pour notre étude un seuil de 4% semble plus adapté au vu des résultats des dosages d'IFN- γ et de TNF- α . Néanmoins le sujet n°12 reste une particularité ne répondant à aucun des tests cellulaires de notre étude. Pour ce dernier cas, il est difficile de conclure à une immunité ancienne lorsque seul le WB est positif. Certaines femmes enceintes présentant des IgG équivoques ou négatives ainsi qu'un WB positif sont probablement mal considérées.

Dans notre étude, nous avons également testé l'expression du CD25⁺ des lymphocytes CD8. En effet, les lymphocytes T CD8, principaux effecteurs de l'immunité anti-toxoplasme auraient pu être un bon marqueur d'activation et refléter l'immunité cellulaire dans la toxoplasmose humaine. Nos résultats montrent que l'expression du CD25⁺ chez les lymphocytes T CD8 après stimulation antigénique de *T. gondii* ne se différencie pas de l'état basal. Ce marqueur n'est donc pas exploitable pour étudier la réponse cellulaire après infection toxoplasmique. Cependant il serait intéressant de découvrir un autre marqueur plus adapté que le CD25 pour étudier cette population de lymphocytes T CD8 dans la toxoplasmose humaine.

Ce travail est une étude préliminaire de la corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire dans la toxoplasmose humaine. Ces résultats montrent qu'un titre faible d'anticorps est majoritairement associé à une réponse cellulaire favorable. Malheureusement le groupe profil douteux, groupe le plus intéressant de l'étude se compose d'un nombre faible de volontaires (n=4 sujets). Dans notre étude, le recrutement de sujets de profil douteux s'est avéré difficile face à une phase préanalytique difficile à gérer (un tube hépariné datant de moins de

24H), et face à une participation basée sur le volontariat. Le recours à une importante population de sujets présentant tous un profil douteux dans une étude prospective apparaîtrait plus approprié permettant ainsi une exploitation plus approfondie des données. De même l'étude de la réponse des lymphocytes T et le dosage de l'IFN- γ et du TNF- α , après stimulation par des souches atypiques (provenant d'Amérique du Sud) pourrait être un réel apport dans la compréhension de la réponse immunitaire contre *T. gondii*. Ainsi nous pourrions comparer la réponse immunitaire après stimulation par des souches atypiques et des souches RH afin de mieux interpréter les cas de toxoplasmoses congénitales rapportés dans la littérature dont nous avons discutés précédemment.

Aucune femme enceinte n'a participé à cette étude en raison des refus des services d'obstétrique de l'assistance des hôpitaux de Marseille (prélèvement d'un tube hépariné acheminé en moins de 24h, consentement à signer) et des longues démarches administratives auprès du comité de protection des personnes. S'exprimer sur l'efficacité de ces tests chez les femmes enceintes paraît aujourd'hui prématurer. En effet le système immunitaire sous l'action des hormones s'oriente vers une réponse cellulaire Th2 stimulant les lymphocytes B, la synthèse d'IL10 et régulant négativement la réponse Th1. Ainsi l'étude de la réponse cellulaire par le dosage d'IFN- γ et de TNF- α et le test d'activation des lymphocytes T CD4 doivent être évalués sur des femmes enceintes lors d'une étude prospective.

Conclusion

La toxoplasmose apparaît généralement bénigne, mais sa survenue pendant la grossesse peut avoir des conséquences critiques sur l'enfant à naître. La gravité des toxoplasmoses congénitales ont conduit à la mise en place d'un programme de prévention avec dépistage sérologique de toutes les femmes enceintes. Ainsi avant ou dès le début de la grossesse, il est impératif de connaître le statut sérologique de la femme enceinte. Un profil sérologique douteux soit une discordance entre deux techniques de dépistage soit des IgG équivoques ou à titres faibles ne permettent pas de déterminer avec certitude le statut immunitaire.

Ainsi dans cette étude, nous avons cherché à savoir si les femmes enceintes à titres faibles d'IgG anti toxoplasmes protégeaient réellement le fœtus d'une infection. Cette étude réalisée chez 25 volontaires immunocompétents, consentants ne présentant pas de grossesse et ayant des statuts sérologiques différents avait pour objectif de définir un seuil d'immunisation en étudiant la réponse cellulaire.

Les volontaires de la cohorte ont été classés en fonction de leur taux d'IgG : groupe négatif avec des IgG négatives, groupe positif avec IgG positives et groupe douteux avec des IgG négatives ou équivoques ainsi qu'un WB positif. La réponse cellulaire de ces 3 groupes a été étudiée à l'aide de dosages d'effecteurs principaux de la résistance contre *Toxoplasma gondii* : IFN- γ , TNF- α et à l'aide de l'analyse de l'activation des lymphocytes (CD4 CD25+ et CD8 CD25+) après stimulation antigénique *in vitro*. Dans un premier temps nous avons démontré que les sujets immunisés (groupe profil positif) présentaient une synthèse plus importante d'IFN- γ et de TNF- α que les sujets non immunisés (groupe profil négatif). De même le groupe profil sérologique positif affichait significativement un taux de lymphocytes activés (CD4 CD25+) plus important que le groupe profil sérologique négatif.

Dans un deuxième temps nous avons étudié la réponse cellulaire des sujets du groupe profil douteux. La réponse cellulaire (taux de lymphocytes CD4 CD25+ et concentrations en IFN- γ , et en TNF- α) du groupe douteux se différenciait significativement de la réponse cellulaire du groupe négatif. Cependant le niveau de la réponse cellulaire n'est pas corrélé aux titres d'anticorps dans le groupe douteux. En effet, parmi les 4 sujets du groupe douteux, nous avons pu constater une certaine hétérogénéité avec des réponses cellulaires plus ou moins marquées. Néanmoins les données se sont avérées rassurantes: dans la majorité des cas les sujets du groupe

douteux ont montré une réponse cellulaire satisfaisante. 1 seul sujet sur 4 (soit 25%) ne présentait pas de réponse cellulaire efficace. Ces résultats montrent qu'un WB n'assure pas à 100 % que la femme enceinte portera son fœtus d'une nouvelle infection. Le nombre de sujets à profils douteux restreint dans cette étude implique des études supplémentaires en prospectif dans une cohorte plus importante.

Enfin le dosage de l'IFN- γ ou du TNF- α , principaux médiateurs de la résistance dans la toxoplasmose pourrait être un test de confirmation intéressant en complément du WB face à des profils indéterminés.

Liste des illustrations

Figure 1: Structure du tachyzoïte de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figure 2: Tachyzoïtes de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figure 3: Bradyzoïtes de <i>Toxoplasma gondii</i> , forme de multiplication lente, contenus dans un kyste cérébral.....	6
Figure 4: Oocystes de <i>Toxoplasma gondii</i> non sporulés à gauche et sporulés à droite (grossissement $\times 1\,000$).....	7
Figure 5: Cycle évolutif de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
Figure 6: Invasion d'une cellule hôte par <i>Toxoplasma gondii</i>	13
Figure 7: Présentation de l'antigène aux lymphocytes T	17
Figure 8: Equilibre entre la réponse protectrice et la réponse régulatrice lors d'une infection à <i>T. gondii</i>	20
Figure 9: Représentation schématique de la réponse immunitaire contre le <i>Toxoplasma gondii</i>	21
Figure 10: Facteurs associés à l'interconversion tachyzoïte- bradyzoïte.....	23
Figure 11: Cinétique des anticorps lors d'une primo-infection contre le <i>Toxoplasma gondii</i>	28
Figure 12: Western blot LDBIO toxo II®	31
Figure 13: Algorithme décisionnel devant une sérologie IgG équivoques/ IgM négatives	32
Figure 14: Protocole de l'étude.....	37
Figure 15: Courbe d'étalonnage dans le dosage de l'IFN- γ par technique ELISA	39
Figure 16: Courbe d'étalonnage dans le dosage du TNF- α par technique ELISA.....	40
Figure 17: Sérologies réalisées de janvier 2018 à juillet 2019 au laboratoire de parasitologie de l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection	42

Figure 18: Distribution et comparaison des concentrations en IFN- γ dans les 3 groupes	47
Figure 19: Représentation des concentrations en IFN- γ en fonction du taux IgG sur Architect [®] des 25 sujets volontaires.....	47
Figure 20: Distribution et comparaison des concentrations en IFN- γ dans les 3 groupes	49
Figure 21: Représentation des concentrations en TNF- α en fonction du taux IgG sur Architect [®]	49
Figure 22: Résultats bruts obtenus sur FACS DIVA	51
Figure 23: Comparaison des % de lymphocytes activés CD4 CD25+ entre le témoin positif, négatif et après stimulation antigénique	52
Figure 24: Distribution et comparaison du % de lymphocytes activés CD4 CD25+ dans les 3 groupes	53
Figure 25: Distribution et comparaison du % de lymphocytes CD8 CD25 + dans les 3 groupes	54

Liste des tableaux

Tableau 1: Répartition de la cohorte	36
Tableau 2: Anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	41
Tableau 3: cohorte de 25 volontaires organisée en 3 groupes en fonction de leur profil sérologique.	44
Tableau 4: concentrations en IFN- γ et en TNF- α des surnageants de la culture cellulaire.....	46

Annexes

Annexe 1 : Règles hygiéno-diététiques

- ✓ Pour éviter la contamination par les kystes :
 - Ne pas consommer de viande mal cuite, en particulier du porc, du mouton et de l'agneau. La viande doit être cuite au cœur du morceau à 67°C ou avoir été congelée trois jours à -12°C. La salaison et le fumage ne détruisent pas les kystes.
 - Se laver les mains après avoir manipulé de la viande crue.

- ✓ Pour éviter la contamination par les oocystes :
 - Une femme enceinte non immunisée peut garder son chat, mais sa litière doit être changée par une autre personne, ou par elle-même, si port de gants.
 - Les chats domestiques doivent rester le plus possible à l'intérieur, et n'être nourris que d'aliments cuits, en conserve ou secs ;
 - La femme enceinte doit :
 - porter des gants au moment de manipuler des substances (sable, terre, éléments de jardinage) pouvant avoir été contaminées par des selles de chat et bien se laver les mains et les ongles par la suite ;
 - Bien se laver les mains et bien laver les ustensiles à la suite de la manipulation d'aliments souillés par de la terre ;
 - Bien peler ou laver les fruits et légumes consommés crus ;
 - Ne pas consommer d'œufs crus ou de lait cru ;
 - Consommer de l'eau en bouteille ;
 - Eviter les fruits de mer (65).

Annexe 2 : Résultats obtenus par cytométrie en flux

		Antigène <i>T. gondii</i> dilution 1						Antigène <i>T. gondii</i> dilution 2					
n° sujet	Profil sérologique	CD45 CD3		CD8	CD8 CD25+	CD4	CD4 CD25+	CD45 CD3		CD8	CD8 CD25+	CD4	CD4 CD25+
		éléments	%	%	% au sein des CD8	%	% au sein des CD4	éléments	%	%	% au sein des CD8	%	% au sein des CD4
1	négatif	10 000,0	80,0	25,1	0,3	70,7	2,2	10 000,0	74,0	25,3	0,2	70,8	1,9
2		4 707,0	42,4	42,4	0,1	42,0	1,8	3 900,0	43,5	17,3	0,7	43,6+	0,7
3		10 000,0	90,0	30,1	0,4	60,7	0,3	7 438,0	89,4	30,4	0,5	60,8	0,4
4		10 000,0	82,0	32,8	0,4	56,9	2,1	10 000,0	85,0	33,5	0,1	55,5	0,8
5		10 000,0	94,0	20,2	0,2	75,3	1,6	10 000,0	80,0	21,5	0,2	74,0	1,8
6		10 000,0	72,0	33,5	0,1	60,6	0,2	10 000,0	81,0	31,2	0,1	59,6	0,3
7		4 349,0	40,0	15,2	0,4	39,8	1,6	5 975,0	45,0	18,9	0,6	45,7	1,9
8		10 000,0	69,0	22,9	0,1	71,1	0,6	10 000,0	68,0	23,4	0,0	71,0	0,7
9		10 000,0	85,0	31,5	0,0	63,8	1,8	10 000,0	94,0	32,0	0,0	63,4	1,5
10	douteux	10 000,0	79,0	25,9	1,8	68,8	7,9	10 000,0	80,0	26,0	1,2	68,1	7,7
11		10 000,0	75,0	27,0	0,5	63,9	4,1	10 000,0	80,0	28,6	0,4	61,5	3,0
12		10 000,0	81,0	18,3	0,1	77,1	2,2	10 000,0	62,0	18,1	0,1	76,2	1,8
13		10 000,0	70,0	22,0	1,8	65,2	4,7	10 000,0	74,0	23,1	1,3	65,3	4,2
14	positif	10 000,0	60,0	40,5	0,8	48,2	6,7	10 000,0	63,0	38,5	1,0	52,8	7,3
15		10 000,0	79,8	13,0	0,2	78,4	5,0	10 000,0	81,0	13,9	1,2	77,8	4,4
16		10 000,0	81,6	26,0	2,1	65,6	10,2	10 000,0	80,0	29,2	3,0	63,0	10,1
17		10 000,0	82,0	31,1	0,5	63,8	5,7	10 000,0	81,0	31,4	0,4	63,8	6,8
18		10 000,0	81,0	30,8	0,4	63,7	8,6	10 000,0	81,0	30,4	0,3	64,7	7,8
19		10 000,0	82,0	18,7	2,2	72,6	5,9	10 000,0	84,0	18,9	2,1	72,0	6,3
20		10 000,0	73,0	20,0	1,4	69,8	9,8	10 000,0	71,0	20,0	1,7	70,9	9,3
21		10 000,0	66,0	20,1	0,4	69,6	10,4	10 000,0	65,0	21,3	0,6	67,3	8,4
22		5 261,0	81,5	34,7	0,8	53,8	7,8	10 000,0	81,0	34,4	1,2	56,1	7,9
23		10 000,0	78,0	27,3	1,3	68,5	8,9	10 000,0	78,0	26,6	1,4	69,1	7,2
24		10 000,0	72,0	43,0	1,9	50,3	7,8	10 000,0	72,0	43,1	1,6	50,9	7,4
25		10 000,0	67,0	34,3	2,2	56,5	11,7	6 997,5	67,0	33,8	2,5	55,7	14,7

		Témoïn négatif							Témoïn positif PHA					
		CD45 CD3		CD8	CD8 CD25+	CD4	CD4 CD25+	CD45 CD3		CD8	CD8 CD25+	CD4	CD4 CD25+	
n°sujet	Profil sérologique	éléments	%	%	% au sein des CD8	%	% au sein des CD4	éléments	%	%	% au sein des CD8	%	% au sein des CD4	
1	négatif	10 000,0	74,0	25,5	0,1	70,4	0,7	10 000,0	62,7	44,1	83,9	65,8	79,0	
2		3 349,0	42,0	13,1	0,4	35,3	0,8	2 063,0	40,0	9,7	63,1	38,2	44,7	
3		10 000,0	87,5	29,8	0,4	62,7	0,3	5 543,0	83,0	52,2	85,2	53,9	73,3	
4		10 000,0	84,0	32,2	0,1	56,8	0,3	6 500,0	63,0	37,1	67,8	44,7	63,2	
5		10 000,0	77,0	20,6	0,1	74,1	1,1	7 650,0	62,0	20,3	68,0	56,8	49,7	
6		10 000,0	81,0	31,0	0,0	59,8	0,2	4 535,0	43,0	36,0	81,1	48,6	69,4	
7		3 571,0	44,5	12,5	0,6	32,4	0,5	1 115,0	43,0	13,6	68,4	20,4	41,0	
8		8 616,0	66,4	26,3	0,2	70,8	0,3	9 841,0	80,0	33,2	81,9	57,8	68,8	
9		10 000,0	88,0	32,2	0,1	62,0	0,5	9 500,0	73,0	27,4	61,0	45,1	36,5	
10	douteux	10 000,0	77,7	24,9	0,1	67,4	0,7	10 000,0	66,0	42,1	87,0	41,5	82,5	
11		10 000,0	80,0	26,5	0,0	63,8	0,3	6 272,0	60,0	40,8	46,6	49,8	36,4	
12		10 000,0	80,0	18,7	0,1	75,3	0,4	2 150,0	48,0	25,7	56,0	48,9	47,5	
13		10 000,0	76,0	22,0	0,2	64,7	0,2	6 173,5	74,0	18,5	71,7	38,1	37,4	
14	positif	10 000,0	54,0	40,0	0,1	49,5	0,3	3 837,0	50,0	31,8	69,8	41,1	58,6	
15		10 000,0	82,4	12,8	0,0	80,7	0,2	4 195,0	74,0	26,7	80,9	78,6	91,2	
16		10 000,0	79,8	23,0	0,3	65,5	0,7	4 420,0	62,0	25,7	78,6	40,5	64,7	
17		10 000,0	84,5	30,6	0,1	63,5	0,4	5 345,0	73,0	44,9	75,8	62,1	85,6	
18		10 000,0	86,2	29,8	0,1	63,2	0,3	6 295,0	57,0	42,5	89,8	66,6	95,2	
19		1 000,0	88,1	18,6	0,5	71,5	0,3	6 807,0	79,0	31,9	89,0	58,1	71,5	
20		10 000,0	71,3	17,2	0,1	73,1	0,2	2 880,0	43,0	15,9	40,0	42,8	44,5	
21		10 000,0	68,2	22,8	0,5	64,0	0,6	5 335,0	56,5	26,5	82,9	37,0	66,4	
22		10 000,0	79,0	36,5	0,1	51,5	0,3	2 688,0	63,0	42,8	74,5	37,0	42,9	
23		10 000,0	84,8	26,0	0,1	69,9	0,3	8 644,5	63,6	41,0	71,5	60,7	75,4	
24		10 000,0	72,0	42,5	0,1	49,8	0,2	3 067,0	56,0	36,3	76,8	41,7	54,5	
25		8 044,0	71,3	32,9	0,2	52,8	0,5	1 919,5	43,3	35,1	88,1	53,3	78,5	

Bibliographie

1. Nicolle C, Manceaux LH. On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908. Int J Parasitol. 1 juill 2009;39(8):863-4.
2. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma). Science. 10 déc 1948;108(2815):660-3.
3. Hutchison WM. Experimental Transmission of Toxoplasma gondii. Nature. mai 1965;206(4987):961-2.
4. Frenkel JK, Dubey JP. Effects of freezing on the viability of toxoplasma oocysts. J Parasitol. juin 1973;59(3):587-8.
5. Su C. Recent Expansion of Toxoplasma Through Enhanced Oral Transmission. Science. 17 janv 2003;299(5605):414-6.
6. Barta JR. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. Vet Parasitol. 22 nov 2001;101(3-4):175-86.
7. Levine ND. Tazonomy of Toxoplasma. J Protozool. févr 1977;24(1):36-41.
8. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. avr 1998;11(2):267-99.
9. Dubey JP. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. Int J Parasitol. juill 1998;28(7):1019-24.
10. Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion. Trends Parasitol. mai 2002;18(5):198-201.
11. Robert-Gangneux F, Darde M-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 1 avr 2012;25(2):264-96.
12. Dumètre A, Dardé ML. How to detect Toxoplasma gondii oocysts in environmental samples? FEMS Microbiol Rev. déc 2003;27(5):651-61.
13. Rougier S, Montoya JG, Peyron F. Lifelong Persistence of Toxoplasma Cysts: A Questionable Dogma? Trends Parasitol. 2017;33(2):93-101.
14. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ. 15 juill 2000;321(7254):142-7.
15. Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme analysis of 35 Toxoplasma gondii isolates and the biological and epidemiological implications. J Parasitol. oct 1992;78(5):786-94.

16. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* déc 1995;172(6):1561-6.
17. Sibley LD, Howe DK. Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;219:3-15.
18. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* sept 2004;34(10):1185-96.
19. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé M-L, Cohen R, Dumètre A, Yera H, et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis.* 15 janv 2009;199(2):280-5.
20. Pino P, Soldati-Favre D. [TgROM4 and TgAMA1: a checkpoint in parasite replication]. *Med Sci MS.* juill 2011;27(6-7):576-8.
21. Sibley LD. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr Opin Biotechnol.* oct 2010;21(5):592-8.
22. Jones EJ, Korcsmaros T, Carding SR. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. *Tissue Barriers.* 2 janv 2017;5(1):e1273865.
23. Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Bennouna S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol.* 9 mars 2004;34(3):411-21.
24. Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol.* 9 mars 2004;34(3):401-9.
25. Yap GS, Sher A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology.* déc 1999;201(2):240-7.
26. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 sept 1994;153(6):2533-43.
27. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 22 avr 1988;240(4851):516-8.
28. Shibuya K, Robinson D, Zonin F, Hartley SB, Macatonia SE, Somoza C, et al. IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 févr 1998;160(4):1708-16.
29. Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 oct 2000;165(8):4515-21.
30. Hauser WE, Tsai V. Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro. *J Immunol Baltim Md 1950.* janv 1986;136(1):313-9.

31. Pepper M, Dzierszinski F, Wilson E, Tait E, Fang Q, Yarovinsky F, et al. Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 mai 2008;180(9):6229-36.
32. Gazzinelli RT, Eltoun I, Wynn TA, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 oct 1993;151(7):3672-81.
33. Deckert-Schlüter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schlüter D. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 avr 1998;160(7):3427-36.
34. El-Sayed NM, Ismail KA, Badawy AF, Elhasanein KF. In vivo effect of anti-TNF agent (etanercept) in reactivation of latent toxoplasmosis. *J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol.* déc 2016;40(4):1459-65.
35. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol.* nov 2012;34(6):793-813.
36. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 janv 1991;146(1):286-92.
37. Shirahata T, Yamashita T, Ohta C, Goto H, Nakane A. CD8+ T lymphocytes are the major cell population involved in the early gamma interferon response and resistance to acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Microbiol Immunol.* 1994;38(10):789-96.
38. Casciotti L, Ely KH, Williams ME, Khan IA. CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells. *Infect Immun.* févr 2002;70(2):434-43.
39. Guan H, Moretto M, Bzik DJ, Gigley J, Khan IA. NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 juill 2007;179(1):590-6.
40. Couper KN, Lanthier PA, Perona-Wright G, Kummer LW, Chen W, Smiley ST, et al. Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 avr 2009;182(7):3985-94.
41. Kahi S, Cozon GJ, Greenland T, Wallon M, Gay-Andrieu F, Peyron F. A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. *Clin Diagn Lab Immunol.* nov 1998;5(6):745-8.
42. Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 juill 1992;149(1):175-80.
43. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharton-Kersten T, Cheever A, Kühn R, et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 juill 1996;157(2):798-805.

44. Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol*. févr 2005;5(2):162-70.
45. Schreiber RD, Feldman HA. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J Infect Dis*. mars 1980;141(3):366-9.
46. Remington JS, Cavanaugh EN. Isolation of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii* from Human Skeletal Muscle and Brain. *N Engl J Med*. 9 déc 1965;273(24):1308-10.
47. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and infection. *N Engl J Med*. 11 2014;371(11):1077.
48. Abou-Bacar A, Pfaff AW, Georges S, Letscher-Bru V, Filisetti D, Villard O, et al. Role of NK Cells and Gamma Interferon in Transplacental Passage of *Toxoplasma gondii* in a Mouse Model of Primary Infection. *Infect Immun*. 1 mars 2004;72(3):1397-401.
49. Shiono Y, Mun H-S, He N, Nakazaki Y, Fang H, Furuya M, et al. Maternal–fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon- γ deficient pregnant mice. *Parasitol Int*. juin 2007;56(2):141-8.
50. Thouvenin M, Candolfi E, Villard O, Klein JP, Kien T. Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent. *Parassitologia*. déc 1997;39(4):279-83.
51. Tourdjman M, Tchéandjieu C, De Valk H, Goulet V, Le Strat Y. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : évolution de la séroprévalence et des facteurs associés entre 1995 et 2010, à partir des Enquêtes nationales périnatales [Internet]. Disponible sur: http://www.invs.sante.fr/beh/2015/15-16/2015_15-16_5.html
52. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet Lond Engl*. 29 mai 1999;353(9167):1829-33.
53. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. juill 2012;10(7):815-28.
54. Rapport d'activité 2017 du CNR toxoplasmose [Internet]. Disponible sur: <http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2019/03/Rapport-CNR-Toxoplasmose-2018-18042018-Final.pdf>
55. Murat J-B, Dard C, Fricker Hidalgo H, Dardé M-L, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Comparison of the Vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow-up of toxoplasmosis in pregnant women and newborns. *Clin Vaccine Immunol CVI*. août 2013;20(8):1203-12.
56. Franck J, Garin YJ-F, Dumon H. LDBio-Toxo II Immunoglobulin G Western Blot Confirmatory Test for Anti-*Toxoplasma* Antibody Detection. *J Clin Microbiol*. 1 juill 2008;46(7):2334-8.
57. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. janv 2016;84(1):22-33.
58. Denis F, Maniez M. Le virus de l'hépatite B, Cahier de Formation Bioforma, n° 21.
59. Haute autorité de santé. Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au

cours de la grossesse [Internet]. 2009. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-12/depistages_prenatals_obligatoires__synthese_vf.pdf

60. Flori P, Chene G, Varlet M-N, Sung RTM. Sérologie de la toxoplasmose chez la femme enceinte: caractéristiques et pièges. *Ann Biol Clin (Paris)*. mars 2009;(2):125–133.
61. Chapey E, Wallon M, L'Ollivier C, Piarroux R, Peyron F. Place of Interferon- γ Assay for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: *Pediatr Infect Dis J*. déc 2015;34(12):1407–9.
62. Chapey E, Wallon M, Debize G, Rabilloud M, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. *J Clin Microbiol*. janv 2010;48(1):41–5.
63. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, 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. Gilligan PH, éditeur. *J Clin Microbiol*. déc 2016;54(12):3034–42.
64. Fatoohi AF, Cozon GJN, Wallon M, Kahi S, Gay-Andrieu F, Greenland T, et al. Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infected hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. mars 2003;22(3):181–4.
65. Haute autorité de santé. Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire. 2017.

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

Résumé

Une primo-infection toxoplasmique au cours de la grossesse peut, en cas de transmission au fœtus, être responsable d'une toxoplasmose congénitale. De ce fait il est primordial de déterminer le statut immunitaire vis à vis du *Toxoplasma gondii* avant ou dès le début de la grossesse. Certains profils sérologiques ne permettent pas de déterminer avec certitude le statut immunitaire : présence d'IgG équivoques, discordance entre deux techniques de dépistage. Face à ces profils sérologiques douteux le western blot ou immunoblot est utilisé comme la technique de confirmation pour mettre en évidence des IgG. Le western blot détectant des faibles quantités d'anticorps, il est justifié de savoir si conclure à une immunité ancienne est sans risque pour fœtus. La réponse immunitaire contre le toxoplasme est de type cellulaire faisant intervenir principalement les lymphocytes T et les cytokines tels que l'IL12, l'IFN- γ et le TNF- α . Les anticorps ayant un rôle mineur dans la réponse immunitaire sont le principal moyen pour diagnostiquer la toxoplasmose chez l'homme.

Ce mémoire a pour objectif d'étudier parallèlement la réponse cellulaire et la réponse humorale lors d'une infection à *Toxoplasma gondii* *in vitro* chez 25 sujets volontaires consentants de profil sérologique différent. La réponse cellulaire a été étudiée par des tests cellulaires : dosage de l'IFN- γ , du TNF- α par méthode ELISA et détection de lymphocytes activés (CD4CD25+, CD8 CD25+) en cytométrie en flux, après stimulation par des antigènes de *Toxoplasma gondii*. La réponse humorale a été quant à elle caractérisée par le dosage d'IgG spécifiques sur Architect®, sur Vidas® et par la réalisation d'un Western Blot. Ainsi les sujets volontaires ont été classés en 3 groupes en fonction de leur profil sérologique : profil sérologique négatif, douteux et positif.

Lors de cette étude, nous avons constaté que les concentrations en IFN- γ , en TNF- α ainsi que le taux de lymphocytes activés (CD4 CD25+) étaient significativement plus élevés chez les sujets immunisés (profil sérologique positif) que chez les sujets non immunisés (profil sérologique négatif). La réponse cellulaire du groupe profil sérologique douteux composé de 4 sujets volontaires était significativement différente de la réponse cellulaire du groupe profil sérologique négatif.

Le niveau de la réponse cellulaire n'était pas corrélé aux titres d'anticorps dans le groupe profil douteux. Cependant les données étaient rassurantes : dans la majorité des cas les sujets du groupe douteux montraient une réponse cellulaire satisfaisante. 1 seul sujet sur 4 (soit 25%) ne présentait pas de réponse cellulaire efficace. Ces résultats montrent qu'un western blot positif n'assure pas à 100 % que la femme enceinte protégera son fœtus d'une nouvelle infection.

Mots-clés : *Toxoplasma gondii* - Toxoplasmose humaine - immunité protectrice anti toxoplasmique - IFN- γ - TNF- α