

Université de Strasbourg
FACULTE DE PHARMACIE DE STRASBOURG

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

**Mise au point et évaluation de la PCR digitale en gouttelette
pour le diagnostic de la Toxoplasmose**

Présenté et soutenu par Elise RECALT
Le 26 octobre 2023

Directrice du mémoire : Madame la Professeure Florence ROBERT-GANGNEUX
Président du jury : Monsieur le Professeur Jean-Marc LESSINGER
Membres du jury : Monsieur le Professeur Benoit JAULHAC
Monsieur le Docteur Denis FILISETTI

Mise au point et évaluation de la PCR digitale en gouttelette (ddPCR) pour le diagnostic de la Toxoplasmose

E. Recalt, F. Robert-Gangneux

Abstract

Le diagnostic de la toxoplasmose est un enjeu de santé publique majeure, car cette infection parasitaire touche près d'un tiers de la population mondiale. Il est donc primordial d'évaluer les performances de nouvelles technologies comme la PCR digitale en gouttelette (ddPCR). Le but de ce travail était d'évaluer rétrospectivement le système de ddPCR Naica® (Stilla Technologies, Villejuif, France) pour le diagnostic de toxoplasmose évolutive, sur une banque de prélèvements de patients avec diagnostic connu. L'analyse de 79 prélèvements positifs et négatifs montre qu'il existe une concordance globale de 97 % ($R^2 = 0,87$; $p < 0.001$) et une bonne corrélation ($R^2 = 0,80$) entre le C_T de la qPCR et la concentration en copie/ μ l obtenu en ddPCR. Cependant nous constatons des difficultés liées à un effet matrice. Pour les LBA, les placentas et le sang, des scores de séparabilité faibles sont visibles et se traduisent par un « effet de pluie » rendant la détermination du seuil de positivité difficile. Une optimisation des programmes en fonction du type d'échantillon est indispensable pour compléter l'évaluation des performances et appréhender d'autres étapes telles que la quantification ou une approche génotypique.

Mots clés : Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, PCR digitale en gouttelette, diagnostic de la Toxoplasmose, évaluation de la ddPCR, comparaison ddPCR vs qPCR, ddPCR système Naica®

Introduction

La toxoplasmose est une infection parasitaire fréquente causée par un protozoaire : *Toxoplasma gondii* (1). Asymptomatique dans 90% des cas chez les patients immunocompétents, il s'agit d'une infection opportuniste pouvant mettre en jeu le pronostic vital de l'immunodéprimé (2). Deux populations principales sont à risque de formes graves : les patients avec un déficit de l'immunité cellulaire et les femmes enceintes dans le cadre d'une toxoplasmose congénitale. On dispose aujourd'hui d'outils diagnostics accessibles permettant d'assurer le dépistage, le diagnostic et le suivi de ces patients. La détermination du profil sérologique est la première étape pour appréhender le risque de primo-infection ou de réactivation. Elle est obligatoire chez la femme enceinte avant la fin du premier trimestre de grossesse (3) et elle fait également parti du bilan initial de découverte d'un VIH (4) et du bilan pré-greffe (5). La recherche directe d'ADN du parasite par biologie moléculaire trouve principalement son indication pour le diagnostic anténatal ou post natal de la toxoplasmose congénitale, ou face à des manifestations cliniques localisées (oculaires, neurologiques) ou disséminées chez les patients immunodéprimés pour lesquels la réaction immune productrice d'anticorps peut être abolie. L'usage de techniques sérologiques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et de la PCR quantitative ont grandement contribué à l'amélioration de la prise en charge des patients pour la toxoplasmose. Depuis quelques années une autre technique de diagnostic moléculaire, la PCR digitale en gouttelettes (*digital droplet PCR*, ddPCR) a montré son potentiel en oncologie pour la détection de mutations (6), mais son intérêt dans le diagnostic des maladies infectieuses reste à démontrer. Une revue publiée début 2019 rapportait l'application de la ddPCR pour la détection de protozoaires, d'helminthes et d'arthropodes (7), avec des perspectives potentiellement intéressantes pour le paludisme et la bilharziose.

Décrite pour la première fois dans les années 90 (8), elle s'est plus largement développée depuis 2010 (9). La ddPCR utilise les mêmes amorces et sondes que la PCR quantitative, mais elle se différencie de cette dernière par son procédé d'amplification. Il repose sur un fractionnement du mix d'amplification contenant l'ADN, en milliers de gouttelettes lipidiques, chacune représentant une chambre de réaction distincte dans laquelle est incorporée aléatoirement la séquence d'intérêt. Les molécules d'acide nucléiques sont amplifiées séparément par réaction de PCR durant l'étape de thermocyclage. Une analyse micro fluïdique rapide des milliers de gouttelettes va permettre de séparer les gouttelettes positives des négatives grâce à leur fluorescence et de convertir les résultats en données numériques. La concentration absolue d'ADN cible peut être calculée à l'aide des statistiques de la loi de Poisson sans avoir besoin d'une courbe standard (10). Différent systèmes commerciaux sont aujourd'hui commercialisés permettant une analyse en puce ou plaque (11). Son usage pour la détection de

Toxoplasma gondii est encore très limité, avec une étude ayant montré un intérêt pour la quantification du parasite (12) et un article d'intérêt vétérinaire (13).

Le diagnostic de la toxoplasmose est un enjeu de santé publique majeur en France. L'intérêt diagnostique de nouvelles technologies comme la ddPCR doit être évalué afin de les positionner dans l'algorithme de prise en charge des patients.

Le but de ce travail était donc d'évaluer rétrospectivement le système de ddPCR Naica® (Stilla Technologies, Villejuif, France) pour le diagnostic de toxoplasmose évolutive, sur des prélèvements de patients avec diagnostic connu.

Matériels et méthodes

Echantillons et patients

Nous avons sélectionné dans la banque d'ADN du laboratoire, 84 échantillons de patients prélevés au cours de la période 2011 – 2023, dans le cadre d'une recherche de toxoplasmose aiguë ou congénitale par qPCR. Les ADN extraits conservés à -20°C ont été utilisés pour évaluer la ddPCR.

Ils consistaient en 20 échantillons négatifs et 64 échantillons positifs provenant de 58 patients avec un diagnostic de toxoplasmose dûment étayé par la clinique, l'imagerie et le suivi après traitement spécifique.

Les matrices étaient les suivantes : abcès et biopsie (n=8), prélèvements oculaires (n=5), liquide broncho-alvéolaire (n=3), liquide cébrospinal (n=3), liquide amniotique (n=8), placenta (n=23), prélèvements de sang (n= 14).

PCR quantitative en temps réel

Le diagnostic initial des échantillons a été réalisé par qPCR en temps réel ciblant rep-529 (GenBank AF146527) lors de la demande d'analyse effectuée en routine par le laboratoire.

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du Kit QIAamp DNA mini-kit ® (de 2011 à 2019) ou du kit DSP virus DNA extraction ® (depuis 2020) (Qiagen, Hilden, Allemagne), en incorporant un contrôle interne d'extraction (CIE) « Yakima Yellow – BHQ1 » (Eurogentec, Liège, Belgique).

La PCR quantitative a été réalisée à partir de 5 µL d'ADN extrait, du mix TaqMan Universal PCR Master mix (Applied biosystems) et des amorces et sonde précédemment décrites (14) et d'amorces et sondes spécifiques du CIE amplifié en duplex. L'amplification et l'analyse informatique étaient effectuées sur QuantStudio 5 et le logiciel QuantStudio™ Design & Analysis Software1.3.1,

respectivement. Les résultats positifs étaient exprimés en cycles (C_T). Tous les résultats positifs jusqu'à 40 C_T étaient pris en considération si la courbe d'amplification était correcte. La quantification en toxoplasmes/mL peut être effectuée à l'aide d'une courbe standard obtenue par dilutions successives au 1/10 d'une suspension calibrée de toxoplasmes fournie par le CNR Toxoplasmose, bien que le résultat ne soit pas diffusé en diagnostic de routine.

PCR digitale en gouttelette

Le système de ddPCR utilisé était la ddPCR Naica® (Stilla Technologies, Villejuif, France) avec une puce Sapphire®, composée de 4 réseaux microfluidiques identiques, permettant d'analyser 4 échantillons.

Pour cette évaluation, les mêmes amorces et sondes que celles utilisées pour la qPCR de routine (cible toxoplasme et contrôle interne), ont été utilisées, en combinaison avec le MIX PCR multiplex Naica® 10X contenant un Buffer A et un Buffer B (référence R10105).

Les conditions réactionnelles étaient les suivantes : 25 µl de mélange réactionnel contenant des amorces et une sonde à des concentrations finales de 500 nM et 200 nM, respectivement, 12,5 µL de Mix PCR multiplex Naica®, 2,5 µL de Mix CIE, 5 µL d'échantillon d'ADN.

Après dépôt du mélange réactionnel sur une puce Sapphire (Stilla Technologies), la partition et les étapes de thermocyclage ont lieu sur le système Géode Naica (Stilla Technologies).

La ddPCR a été réalisée selon le programme suivant : partitionnement à 40°C programme « Sapphire V1 », réaction enzymatique de 2 minutes à 50°C, dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C, suivie de 45 cycles de 15 secondes à 90°C et d'1 minute à 60°C pour l'hybridation et l'élongation. La ddPCR se termine par 1 minute à 40°C puis d'une étape de libération selon le programme « Sapphire V1 ».

L'analyse de la fluorescence des puces et l'acquisition d'image a été réalisée avec le Prisme Naica moins de 24h après le thermocyclage. L'étude des données et l'interprétation ont été effectuées à l'aide du logiciel Crystal Miner (Stilla Technologies, Villejuif, France) (15).

Le programme de ddPCR a été validé par le passage de 2 points de gamme de concentration connue (10^3 parasites/mL et 10^4 parasites/mL). Le seuil de positivité et un seuil de fluorescence ont été définis par le passage de plusieurs échantillons ($n = 20$) contenant de l'eau ou des prélèvements de diverses matrices de patients sains.

Seules les puces donnant plus de 10 000 gouttelettes ont été analysées. Le seuil de positivité des échantillons positifs a été fixé automatique par le logiciel Cristal Miner ou adapté manuellement sur les graphiques d'analyse 1D. Le score de séparabilité est fourni directement par le logiciel d'analyse, un score supérieur à 5 atteste de la séparation correcte des populations positives et négatives.

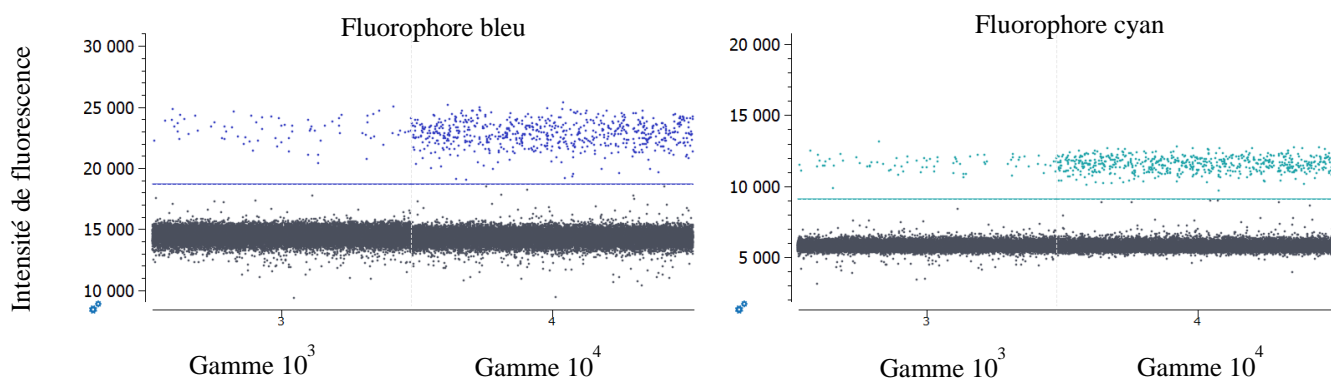
Statistiques

La concordance des résultats a été évalué grâce à l'indice kappa de Cohen dont la valeur détermine la force de l'accord selon l'interprétation suivant : < 0 médiocre, 0,01-0,20 léger, 0,21 – 0,40 passable, 0,41 – 0,60 modéré, 0,61 – 0,80 substantiel, 0,81 – 1,0 presque parfait (16). Une analyse de corrélation de Spearman entre les résultats de qPCR et de ddPCR a été réalisée ainsi qu'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour la comparaison des scores de séparabilité entre échantillons. L'ensemble des statistiques a été effectué avec la version 9 du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Les résultats discordants ont été repassés en qPCR et/ou ont été analysé sur une 2^e série de ddPCR avec une dilution préalable.

Résultats

Validation des conditions de ddPCR et d'interprétation des résultats

Le programme de ddPCR a été approuvé avec le passage d'une puce contenant 2 points de gammes de concentration connue (10^3 parasites/mL et 10^4 parasites/mL) (Figure 1 - a) et deux négatifs. Les 2 cibles rep-529 et le CIE sont détectés respectivement sur le canal bleu foncé et cyan. La partition a réussi avec un nombre total de gouttelettes produites supérieur à 19 000 pour les 2 échantillons positifs. Le seuil a été fixé automatiquement et le score de séparabilité est supérieur à 5 (Figure 1 - b). La quantification en copies/ μ L affichait un ratio 1/10, attendu pour les deux concentrations testées. Pour valider les conditions générales d'interprétation, l'ensemble des 20 échantillons négatifs a été passé. Le seuil d'intensité de fluorescence a été fixé à 18730 unités de fluorescence pour rep-529. Il a été calculé grâce à l'export des données de fluorescence de la totalité des gouttelettes des échantillons négatifs et représente la moyenne de l'intensité de fluorescence des échantillons négatifs associé à 3 écart-types. Le seuil de positivité a été défini comme strictement supérieur à 2 gouttelettes car 4 échantillons négatifs présentent une ou deux gouttelettes au-dessus du seuil de fluorescence.

a**b**

Echantillon	Score de séparabilité	Nombre de gouttelettes			Concentration (cp/μl)			Incertitude relative (IC 95%)
		Totales	Positives	Négatives	Moyenne	Minimale	maximale	
Gamme 10 ³	9,1	19092	73	19019	30,7	23,7	37,8	23%
Gamme 10 ⁴	8,3	20850	660	20190	257,9	238,3	277,6	8%

Figure 1 : Validation des conditions de ddPCR et d'interprétation des résultats

(a) Analyse des 2 points de gamme 10³ parasites/mL et 10⁴ parasites/mL sur les graphiques d'analyse 1D. Observation d'une séparation franche des gouttelettes positives des gouttelettes négatives dépendante de leur fluorescence pour la cible rep-529 (fluorophore bleu) et le CIE (fluorophore cyan).

(b) Tableaux récapitulatifs des paramètres obtenus pour 2 points de gamme, comprenant le score de séparabilité, le nombre de gouttelettes produites lors de la partition, les concentrations en copies/μl et l'incertitude relative.

Suite à la validation de ces conditions, l'ensemble des échantillons a été passé. La gestion des résultats est décrite dans la figure 2. Cinq échantillons (2 échantillons négatifs et 3 échantillons positifs de placenta, de sang et une biopsie) n'ont pas rempli les critères de qualité (<10000 gouttelettes générées) et ont été exclus de l'analyse. L'étape de partition a été un succès dans 94% des cas

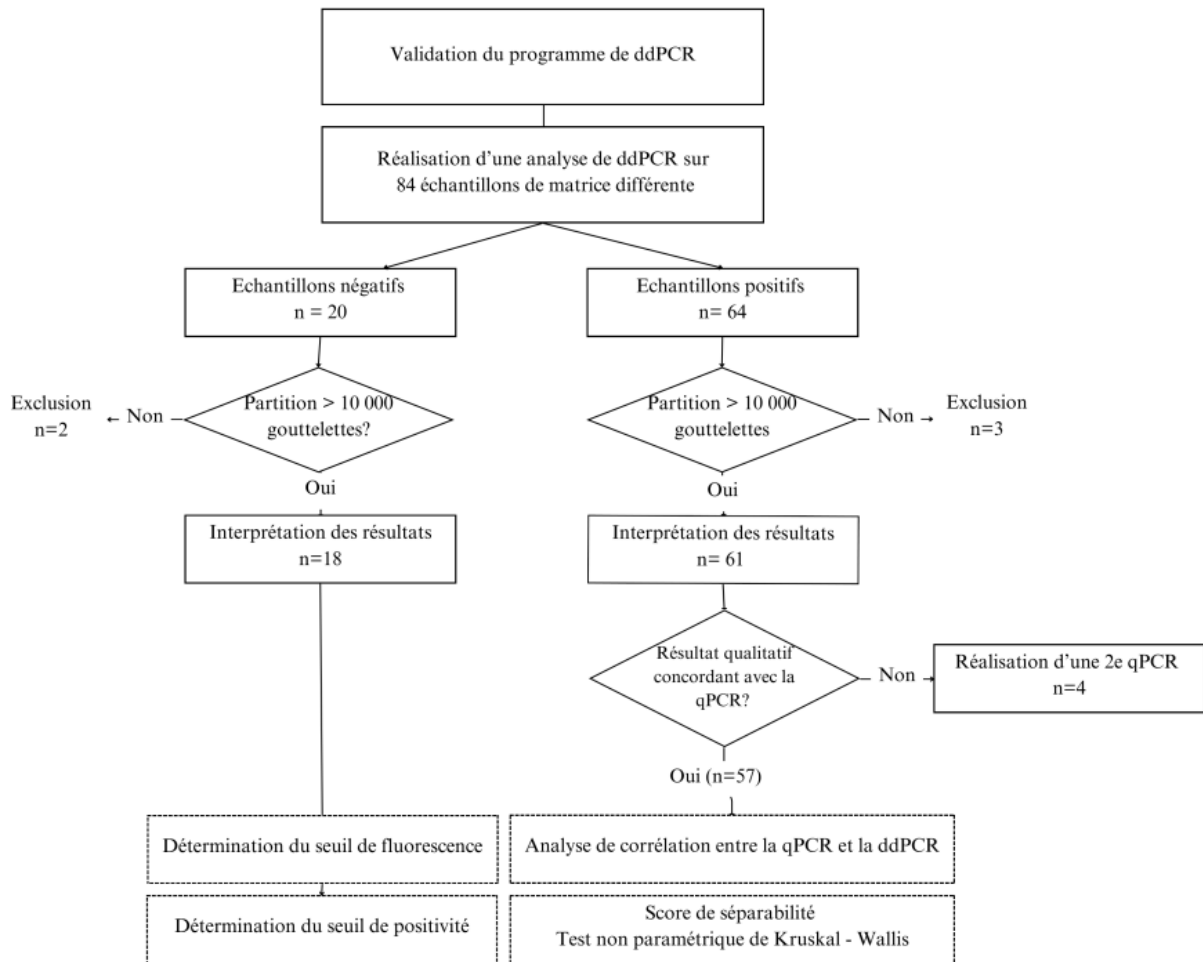


Figure 2 : Plan d'étude de la mise au point et de l'évaluation de la ddPCR par rapport à la qPCR sur 84 échantillons de patients prélevés au cours de la période 2011 – 2023.

Concordance ddPCR et qPCR

L'interprétation a pu être effectuée sur 79 échantillons comprenant 18 échantillons négatifs et 61 échantillons positifs (Tableau 1). La concordance globale de la ddPCR et la qPCR était de 97 % (57/59) avec un indice kappa de Cohen de 0,93 confirmant un accord « presque parfait » des résultats entre les 2 techniques (Tableau 2).

On relève initialement 4 échantillons discordants entre le résultat de ddPCR et de qPCR initiale : ces derniers ont été repassés en duplicata en qPCR pour réévaluer leur résultat. Deux échantillons étaient négatifs sur cette 2^{ème} qPCR, en approbation avec le résultat de ddPCR. Ils ont été inclus dans les résultats négatifs pour la suite de l'interprétation. Les 2 autres échantillons étaient confirmés positifs en qPCR avec un C_T à 37 et à 39, marqué par la présence d'inhibiteur. Une nouvelle ddPCR a été réalisé pour ces 2 échantillons, avec une dilution au 1/10^e et au 1/50^e : sans modification de résultat. Il n'est pas

possible de conclure sur le rôle de l'inhibition car les 2 échantillons ne possédaient pas le même CIE (changement de fournisseur), il n'était donc plus détectable.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des résultats de ddPCR obtenus pour les 79 échantillons interprétables. Les échantillons dont l'étape de partition a été un échec ont été exclus (n=5). Les résultats sont présentés en tenant compte de la matrice, du C_T moyen de la qPCR et des différents paramètres de ddPCR.

Echantillons analysables	ddPCR				
	C_T qPCR moy \pm SE	Gouttelettes totales moy \pm SE	Gouttelettes positives moy \pm SE	C (cp/ μ l) moy \pm SE	Score séparabilité moy \pm SE
Positifs					
Biopsie et abcès (n=7)	22,7 \pm 3,6	20641,0 \pm 1712,7	8111,1 \pm 9503,5	9025,3 \pm 13980,8	7,8 \pm 1,0
Pr. Oculaires (n=5)	32,4 \pm 5,4	21366,0 \pm 601,4	1652,0 \pm 3605,5	772,5 \pm 1694,8	7,2 \pm 2,7
LBA (n=3)	31,3 \pm 7,4	21733,3 \pm 2649,8	496,3 \pm 826,0	215,1 \pm 360,0	4,5 \pm 1,9
LCS (n=3)	31,3 \pm 1,0	19372,7 \pm 1636,9	202,4 \pm 214,1	37,4 \pm 101,8	8,8 \pm 2,1
Liq. amniotique (n=7)	32,0 \pm 2,1	20075,1 \pm 2212,2	604,3 \pm 998,5	286,6 \pm 502,6	6,2 \pm 2,1
Placenta (n=22)	32,3 \pm 4,3	21284,7 \pm 2177,5	682,1 \pm 2961,8	461,1 \pm 2076,7	4,7 \pm 1,8
Sang (n=10)	34,7 \pm 4,9	20885,6 \pm 1162,9	143,6 \pm 435,5	60,0 \pm 182,5	4,6 \pm 2,3
Négatifs					
Asp. Trachéale (n = 1)	NA	20570	0	NA	NA
Blanc (n=8)	NA	21173,7 \pm 1178,4	2,0 \pm NA	NA	NA
LBA (n=2)	NA	20885,3 \pm 692,8	0,5 \pm NA	NA	NA
LCS (n=3)	NA	21273,3 \pm 1628,6	0	NA	NA
Liquide amniotique (n=1)	NA	21698	0	NA	NA
Pr. Oculaire (n= 1)	NA	20820	0	NA	NA
Sang (n=2)	NA	19516 \pm 335,2	0	NA	NA
Urine (n=2)	NA	20321,0 \pm 1105,9	0,5 \pm NA	NA	NA
Discordants					
Sang (n =2)	40 / 37*	18720	0	NA	NA
	33 / 39*	20123	0	NA	NA

* 1^{ère} puis 2^{ème} qPCR

Tableau 2 : Concordance des résultats obtenus en ddPCR par rapport aux résultats de qPCR, après réalisation d'une 2^e qPCR si discordance initiale, sur les 79 échantillons positifs et négatifs analysables.

	ddPCR		Total
	négative	positive	
qPCR	négative	20	20
	positive	2	59
Total	22	57	79

Corrélation des résultats

Il y a une corrélation entre la ddPCR et la qPCR sur les échantillons analysés (Pearson $R^2 = 0,80$, $p < 0.001$), entre la concentration en copies/ μl et la valeur de C_T obtenue par les 2 techniques (Figure 4).

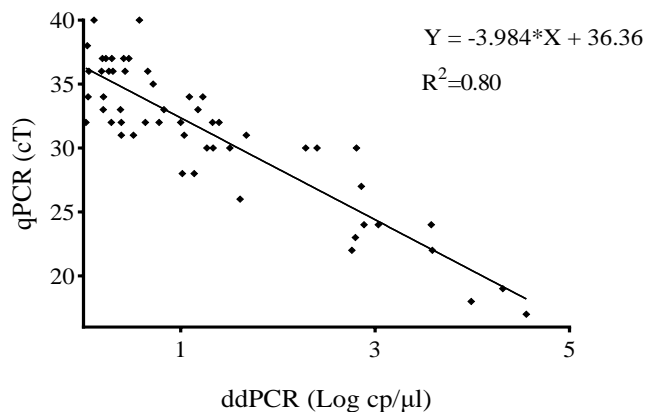


Figure 4 : Droite de corrélation entre la PCR quantitative (C_T) et la ddPCR dont le résultat est exprimé en copies/ μl (échelle logarithmique).

La corrélation en termes de copies/ μL est moins claire lorsque l'on analyse les résultats des points de gamme. Les résultats obtenus (Figure 1 - a) ont montré que le point de gamme 1000 toxoplasmes/mL affichait environ 30 copies/ μL en ddPCR. Partant d'une prise d'essai de 5 μL et d'un nombre attendu de copies de rep-529 de 200 à 300/toxoplasme pour une souche de type II, la quantification attendue était de 40 à 60 copies/ μL . De la même façon, la quantification attendue pour le point 10⁴ toxoplasmes/mL était de 400 à 600 au lieu de 257 copies/ μL .

Score de séparabilité

On remarque des scores moyens de séparabilité faibles (< 5) pour certaines matrices : LBA, placenta, sang (Figure 5). La différence de score de séparabilité est significative entre les différentes matrices des échantillons ($p = 0,0047$) et ne semble pas liée à la charge parasitaire de l'échantillon, $R^2 = 0.23$ (Figure 6).

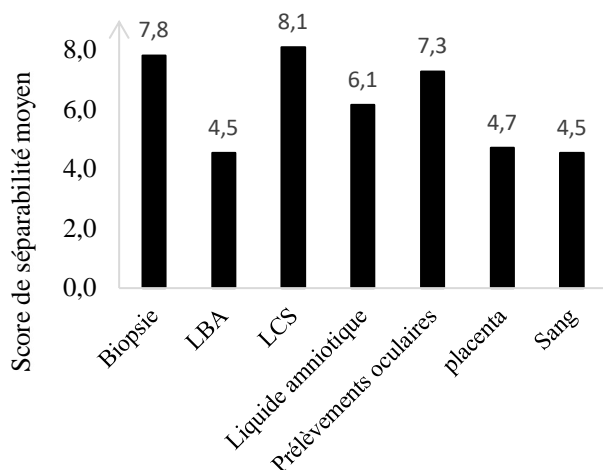


Figure 5 : Score de séparabilité moyen observé pour les différentes matrices d'échantillons.

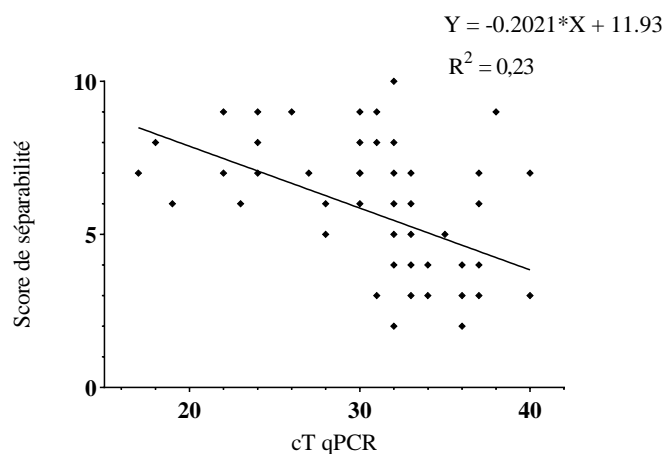


Figure 6 : Corrélation entre le score de séparabilité et le résultat de C_T de la qPCR réalisé au diagnostic.

Discussion

De nombreuses exigences de performance doivent être prises en compte pour valider le programme de ddPCR (recommandations MIQE) (17), comme pour la qPCR. Dans cette étude, nous avons évalué le comportement d'échantillons de différentes matrices pour la détection de *Toxoplasma gondii*. Nous nous sommes donc intéressés à l'étape de partition, à l'intensité de fluorescence, à la séparation des populations positives / négatives et également à la concordance et à la corrélation des résultats de ddPCR par rapport à la qPCR. Les essais préliminaires effectués sur une puce Sapphire comprenant 2 points de gamme de concentration connue nous ont donné des résultats satisfaisants ce qui nous a permis d'appréhender les essais sur des échantillons biologiques.

Notre étude met en évidence une bonne concordance globale et une forte corrélation entre la ddPCR et la qPCR. En effet nous avons déterminé une concordance de 97% avec un indice de Cohen de 0,94, démontrant bien que la ddPCR présente des performances élevées similaires à la qPCR. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature pour d'autre micro-organismes (18) et sont encourageant pour le développement de la technique.

A l'analyse des prélèvements, nous constatons que l'étape de partition n'est pas effective pour tous les échantillons. Décrit par le fabricant, les défauts de cette étape rendent parfois l'analyse totalement ininterprétable (nombre de gouttelettes < 10 000). On relève la présence de bulle d'air, d'une hétérogénéité de production des gouttelettes et d'artéfacts. En théorie ces défauts peuvent se corriger

par la formation et l'expérience de l'opérateur, mais on constate qu'ils sont survenus aléatoirement tout au long des séries.

Nous avons constaté que deux échantillons présentant des inhibiteurs en qPCR restaient négatifs lors de notre analyse malgré une dilution au 1/10^e et au 1/50^e. Bien que la ddPCR soit moins sensible à l'effet d'inhibition, elle n'en est pas totalement immunisée (19). Le diagnostic a été prouvé par l'imagerie et la clinique, nous nous attendions donc à un résultat positif en ddPCR sur ces échantillons. Cependant les 2 échantillons négatifs sont des prélèvements de sang avec des charges parasitaires faibles marqués par la présence d'inhibiteur, une évaluation de la répétabilité des résultats avec des échantillons de charge parasitaire faible sera intéressante pour mieux appréhender ces résultats.

La qPCR est actuellement la technique de référence mais on sait qu'en fonction de la matrice et du contexte du patient, les performances de sensibilité de la qPCR sont variables (20). Les résultats pour la recherche de toxoplasmose en qPCR sont fortement impactés par la présence d'inhibiteurs liés à certaines matrices comme le placenta, ce qui implique en routine le passage d'échantillons en doublons associé ou non à une dilution.

Nous mettons en évidence un effet matrice important, qui s'est traduit par des variations du seuil d'intensité de fluorescence des populations négatives. De ce fait, l'application d'un seuil automatisé permettant la distinction entre les éléments positifs et négatifs n'est pas possible et n'est pas non plus applicable pour des échantillons d'une même matrice mais passés sur des séries d'analyse différentes. Cette contrainte impose l'application d'un seuil manuel et induit un biais lié à l'opérateur. Par conséquent la détermination du seuil devrait être définie par plusieurs opérateurs pour limiter la subjectivité de ce choix et être associée à une étude d'impact pour évaluer le risque des variations occasionnées. L'idéal serait de passer sur une même puce un seul type de matrice, incluant un négatif et un échantillon positif connu et standardisé, ce qui pourrait permettre de déterminer un seuil plus aisément, mais doublerait le prix du test, déjà élevé.

Pour trois matrices (LBA, sang, placenta) nous avons rencontré des difficultés pour distinguer les populations positives et négatives, liées à un effet de « pluie », c'est-à-dire une séparation peu franche. Malgré un essai de modification des concentrations de la sonde, nous n'avons pas observé de variation de fluorescence des gouttelettes, ni de séparation plus marquée. Cet effet visible sur les graphiques d'analyse 1D se traduit par des scores de séparabilité très faible pour certains échantillons et semble lié à la matrice de l'échantillon et non à la charge parasitaire. Des études indiquent que la pluie résulte souvent d'un mauvais paramétrage du programme de ddPCR, notamment d'une température d'hybridation sous-optimale (21) ou de la présence d'inhibiteurs (22). Elles suggèrent qu'un nombre de cycles plus élevés, des temps d'élongation plus longs, associés à des températures adéquates pourraient réduire cette pluie et améliorer la séparabilité des gouttelettes (23). Il convient de réévaluer le programme en s'intéressant à chaque matrice d'intérêt pour déterminer le paramétrage optimal. Les partitions pluvieuses contiennent probablement des fractions positives. Cependant, dans notre étude, la présence de ce phénomène ne semble pas impacter les résultats qualitatifs de nos échantillons.

La quantification n'est pas indispensable au diagnostic d'une toxoplasmose aigue ou congénitale, cependant le suivi de la charge parasitaire est un bon indicateur de l'évolution de l'infection et de l'efficacité du traitement (24). La bonne corrélation entre le C_T de qPCR et la ddPCR est un indice encourageant, qui, couplé à la faible sensibilité de la ddPCR aux inhibiteurs, pourrait permettre d'approcher la quantification des charges parasitaires de façon plus fiable. Certaines études récentes sur les levures (25) ou sur le SARS-COV2 (26) ont démontré que la ddPCR pouvait avoir de gros avantages pour la quantification grâce à l'absence de courbe standard, une meilleure sensibilité et de plus faibles variations que la qPCR.

La quantification absolue n'était pas l'objet de notre étude, mais nous avons constaté sur les deux points de gamme testés, un ratio correct de l'estimation du nombre de copies/ μ L entre les deux concentrations testées, mais une quantification légèrement inférieure à celle attendue pour une souche de type II (500 à 750 parasites/mL pour le point 1000/mL et 4280 à 6425/mL pour le point 10000/mL). Ces résultats sont en accord avec les variations décrites du nombre de copies de rep-529, qui pourrait de 4 à 8 fois moins que décrit initialement (27). Les résultats que nous avons obtenus sont donc tout à fait acceptables.

Au total, la ddCPR est une technique émergente en microbiologie dont les performances pourraient être intéressantes pour la détection et la quantification de *Toxoplasma gondii*. Cependant, la diversité des matrices utilisées en diagnostic clinique nécessite des ajustements complexes pour une optimisation de son utilisation et le coût élevé reste un frein.

Bibliographie

1. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 12 juin 2004 ;363(9425):1965-76.
2. Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, Accoceberry I, Menotti J, Cassaing S, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients : a 3-year multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol*. mai 2015 ;53(5):1677-84.
3. Robinson E, de Valk H, Villena I, Le Strat Y, Tourdjman M. National perinatal survey demonstrates a decreasing seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in France, 1995 to 2016: impact for screening policy. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. févr 2021 ;26(5):1900710.
4. Elsheikha HM, Marra CM, Zhu XQ. Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Management of Cerebral Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 25 nov 2020 ;34(1):10.1128/cmr.00115-19.
5. Soave R. Prophylaxis Strategies for Solid-Organ Transplantation. *Clin Infect Dis*. 1 juill 2001;33(Supplement_1): S26-31.
6. Gezer U, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. The Clinical Utility of Droplet Digital PCR for Profiling Circulating Tumor DNA in Breast Cancer Patients. *Diagn Basel Switz*. 5 déc 2022 ;12(12):3042.
7. Pomari E, Piubelli C, Perandin F, Bisoffi Z. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Infect*. 1 déc 2019;25(12):1510-6.
8. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*. sept 1992;13(3):444-9.
9. Galimberti S, Balducci S, Guerrini F, Del Re M, Cacciola R. Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagn Basel Switz*. 24 mai 2022;12(6):1305.
10. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 15 nov 2011;83(22):8604-10.
11. Dong L, Meng Y, Sui Z, Wang J, Wu L, Fu B. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Sci Rep*. 25 août 2015; 5:13174.

12. Nabet C, Brossas JY, Poignon C, Bouzidi A, Paris L, Touafek F, et al. Assessment of Droplet Digital PCR for the Detection and Absolute Quantification of *Toxoplasma gondii*: A Comparative Retrospective Study. *J Mol Diagn JMD*. juill 2023;25(7):467-76.
13. Mancusi A, Giordano A, Bosco A, Girardi S, Proroga YTR, Morena L, et al. Development of a droplet digital polymerase chain reaction tool for the detection of *Toxoplasma gondii* in meat samples. *Parasitol Res*. 2022;121(5):1467-73.
14. Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C, et al. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*. janv 2010;29(1):33-8.
15. Madic J, Zocevic A, Senlis V, Fradet E, Andre B, Muller S, et al. Three-color crystal digital PCR. *Biomol Detect Quantif*. 1 déc 2016; 10:34-46.
16. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Medica*. 15 oct 2012;22(3):276-82.
17. The dMIQE Group, Huggett JF. The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clin Chem*. 1 août 2020;66(8):1012-29.
18. Park C, Park D, Hassan ZU, Choi SH, Kim S. Comparison of RT-qPCR and RT-ddPCR with Rift valley fever virus (RVFV) RNA. *Sci Rep*. 22 févr 2023;13(1):3085.
19. Nixon G, Garson JA, Grant P, Nastouli E, Foy CA, Huggett JF. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus. *Anal Chem*. 6 mai 2014;86(9):4387-94.
20. Ludwig A, D'ambrosio Fernandes F, Rojas Guerra R, Braünig P, Silva Ramos L, Souto Pacheco L, et al. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in placentas of women who received therapy during gestation in a toxoplasmosis outbreak. *Infect Genet Evol*. 1 janv 2022; 97:105145.
21. Witte AK, Mester P, Fister S, Witte M, Schoder D, Rossmann P. A Systematic Investigation of Parameters Influencing Droplet Rain in the *Listeria monocytogenes* *prfA* Assay - Reduction of Ambiguous Results in ddPCR. *PloS One*. 2016;11(12): e0168179.
22. Vynck M, Vandesompele J, Thas O. Quality control of digital PCR assays and platforms. *Anal Bioanal Chem*. oct 2017;409(25):5919-31.

23. Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN, Boivin G. Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *J Virol Methods*. nov 2015; 224:58-66.
24. Patrat-Delon S, Gangneux JP, Lavoué S, Lelong B, Guiguen C, le Tulzo Y, et al. Correlation of Parasite Load Determined by Quantitative PCR to Clinical Outcome in a Heart Transplant Patient with Disseminated Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. juill 2010;48(7):2541-5.
25. Chen B, Xie Y, Zhang N, Li W, Liu C, Li D, et al. Evaluation of Droplet Digital PCR Assay for the Diagnosis of Candidemia in Blood Samples. *Front Microbiol*. 3 sept 2021; 12:700008.
26. Liu C, Shi Q, Peng M, Lu R, Li H, Cai Y, et al. Evaluation of droplet digital PCR for quantification of SARS-CoV-2 Virus in discharged COVID-19 patients. *Aging*. 1 nov 2020;12(21):20997-1003.
27. Costa JM, Bretagne S. Variation of B1 gene and AF146527 repeat element copy numbers according to *Toxoplasma gondii* strains assessed using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. avr 2012;50(4):1452-4.