

Recherche de Toxoplasmes dans le placenta : Recommandations techniques ⁽¹⁾

Deux techniques biologiques sont actuellement utilisées pour la mise en évidence de *Toxoplasma gondii* dans le placenta : la PCR et l'inoculation à la souris. La culture cellulaire, technique peu sensible, est aujourd'hui quasiment abandonnée.

Intérêt général et Indications

La recherche du parasite dans le placenta fait habituellement partie du diagnostic néo-natal de la toxoplasmose congénitale. Il s'agit d'une analyse :

- (i) complémentaire à la recherche d'anticorps (incluant le Western blot) chez le nouveau-né, chez qui les analyses sérologiques sont indispensables,
- (ii) particulièrement indiquée en l'absence de diagnostic prénatal ou si celui-ci est négatif,
- (iii) ayant également un intérêt épidémiologique, en permettant l'isolement de souches de *T. gondii*.

Paramètres analytiques

Quelques études ont analysé la valeur de la détection du toxoplasme dans le placenta (PCR et inoculation à la souris) [1-8, 11-13] ; les performances analytiques des méthodes utilisées sont résumées dans le tableau ci-dessous. Les très bonnes valeurs de VPN confortent l'intérêt de cette recherche dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

Technique	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
Inoculation à la souris	42-67%	92-100%	91-100%	76-100%
PCR ⁽²⁾	25-71%	92-99%	45-93%	84-90%
PCR + inoculation à la souris	25-71%	88-99%	63-97%	86-91%

¹ Ces recommandations font suite aux enquêtes sur les pratiques et méthodes du diagnostic de la toxoplasmose en France de 2007 qui ont révélé une très grande disparité dans les pratiques. Elles sont issues d'un groupe de réflexion du Pôle "Biologie moléculaire" du CNR Toxoplasmose et sont basées sur différents niveaux de preuve (prenant en compte en partie les données publiées, les pratiques les plus répandues et le bon sens).

² Une étude comparant 2 techniques de PCR, ciblant l'une le gène B1 et l'autre l'élément répété rep529, a montré une sensibilité supérieure de la PCR ciblant rep529 [8]. Par ailleurs, une autre étude récente a montré que la VPP de la PCR sur le placenta augmente régulièrement (de 25 à 93%) en fonction de la date de contamination au cours de la grossesse [12].

Aspects techniques - Modalités pratiques

La méthode de préparation du placenta utilisée en France par la majorité des centres est basée sur celle décrite par G. Desmonts et J. Couvreur en 1974 [14].

- **Prélèvement:** Placenta dans sa totalité, sinon **au moins 200g** de placenta [6, 7, 8].

- **Acheminement dans un récipient propre et hermétique:** A conserver à +4°C et à acheminer à +4°C, ou à température ambiante si transport < 6-8 h. L'immersion complète de l'échantillon dans du sérum physiologique additionné d'antibiotiques est recommandée dès ce stade et permet une meilleure conservation.

- **Conservation à réception:** à +4°C après immersion dans du PBS ou sérum physiologique additionné d'antibiotiques.

Antibiotiques: 100 U/mL de pénicilline associés à 100 µg/mL de streptomycine ou à 50 µg/mL de gentamicine (concentrations finales dans la solution de conservation proches de celles utilisées pour la culture cellulaire, à adapter également en fonction du fournisseur) [4, 6, 14].

- **Technique:** Si nécessaire, rincer le placenta avec de l'eau, puis prélever plusieurs morceaux en différents sites du placenta pour atteindre 50 à 200g de tissu à analyser (ne pas prendre l'enveloppe et les parties nerveuses) [4, 6, 14].

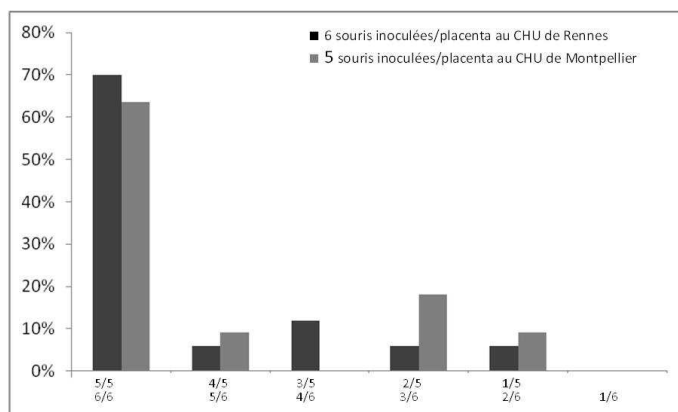
(i) **Méthode de broyage:** Broyer le fragment avec 200mL de PBS contenant de la trypsine (concentration finale de 2.5µg/mL dans la préparation) [4, 6, 14], puis incuber ce broyat sous agitation à 37°C durant 1h à 2h, puis le filtrer à travers une gaze stérile [4, 6, 14]. Le filtrat est récupéré dans plusieurs tubes (2 à 4 tubes de type Falcon® de 40 mL par exemple), centrifugé (10min à environ 2000g, soit le plus souvent 3000 rpm) puis au moins trois lavages sont réalisés (jusqu'à obtention d'un surnageant clair) avec la solution de conservation (solution salée additionnée d'antibiotiques [14]). Les culots peuvent ensuite être regroupés.

(ii) **Décontamination du broyeur:** Le broyage est le plus souvent réalisé avec un broyeur (de type Smasher, AES ou Stomacher 400, Prolabo) ou un mixeur (de type Blender), parfois en utilisant des scalpels à usage unique. La décontamination du matériel n'est pas nécessaire si le prélèvement est maintenu dans un sachet à usage unique. En effet, l'utilisation d'un homogénéiseur de laboratoire, disposant de deux pales oscillantes, permet le broyage du placenta placé dans un sac en plastique stérile, étanche et à usage unique. L'utilisation de ce procédé évite la décontamination du matériel de broyage et les éventuelles contaminations croisées. Dans les autres cas, soit une stérilisation par autoclave soit une décontamination du matériel doit être effectuée afin de débarrasser le matériel de traces d'ADN de Toxoplasme susceptibles de contaminer le prélèvement suivant. Le protocole de

décontamination consiste en un trempage d'au moins 15 minutes en solution de détergent-désinfectant (type Salvianos + RBS, Hexanios, ou décontamination à l'alcool) ou 2h avec de l'eau de javel 2.6%, puis en un rinçage à l'eau permutée et séchage.

Inoculation aux souris

Une fraction du culot (de 200µl à 1 mL de produit pathologique/souris [14]) est inoculée à plusieurs souris (2 à 6); un nombre important de souris semble assurer un taux de réussite plus important de cet examen (figure ci-dessous). On peut diluer un peu le culot si celui-ci est trop épais. Une autre fraction du culot est soumise à extraction d'ADN. Les culots restants peuvent être congelés à -80°C.



Extraction d'ADN à partir de placenta

En l'absence de données bibliographiques suffisamment détaillées, les modalités d'extraction d'ADN à partir de placenta proposées ci-dessous ont été déterminées d'après les résultats de l'enquête réalisée par le CNR en 2007.

Quantité de placenta (ou de culot après lavage) utilisée pour réaliser la PCR : Une fraction du culot (de 200µl à 1mL) est extraite. Une ou deux extractions (56% des centres répondants faisaient 2 extractions) sont réalisées par placenta (soit 5 à 10g de tissu sur la base de 200g).

Méthodes utilisées : Elles font toutes appel à une lyse cellulaire via la protéinase K, suivie d'une extraction par kit (la méthode manuelle Qiagen protocole "tissue" étant la plus utilisée: 80% des réponses).

Réalisation de la PCR

Le volume d'ADN obtenu après extraction varie selon la méthode de 50 à 200µl (200µl étant le volume le plus fréquemment utilisé: environ 80% des réponses) pour une prise d'essai allant de 2 à

5µl par PCR (5µl dans environ 90% des cas). Au minimum, 2 réactions de PCR sont réalisées par extraction, ce qui correspond à environ 2 à 5g de placenta analysé au total (10% de la totalité de l'échantillon sur une base de 200g).

Interprétation

La positivité de la PCR et/ou celle de l'inoculation à la souris à partir d'un placenta ne sont pas à elles seules des arguments définitifs pour une toxoplasmose congénitale (cf. valeurs prédictives). Cependant, la positivité d'une de ces deux techniques augmente fortement la probabilité de toxoplasmose congénitale (cf. VPP sur le Tableau) et impose une attention toute particulière avec un suivi sérologique (incluant le western blot) impératif de l'enfant.

Rappelons que, quelle que soit la technique employée (PCR ou inoculation à la souris), la capacité à détecter le parasite au niveau placentaire peut être altérée par le traitement antiparasitaire [4, 6, 10, 11].

Conclusion

In fine, bien que ce point soit encore controversé, les données de la littérature sont plutôt en faveur de la réalisation de cet examen dans le bilan néonatal. Son intérêt est particulièrement grand en cas de non-réalisation du DPN et de non-suivi ou de suivi insuffisant au cours de la grossesse. La PCR pose le problème des inhibitions de la réaction, plus fréquente avec ce type de prélèvement tissulaire qu'avec des prélèvements pauci-cellulaires. Toutefois, réalisée dans les règles de l'art, elle se montre aujourd'hui plus sensible que l'inoculation à la souris.

Par ailleurs, le placenta représente le meilleur type de prélèvement pour l'isolement de souches de *T. gondii* par inoculation à la souris. Actuellement, le typage des souches de *T. gondii* isolées de placentas n'a pas d'application directe dans la prise en charge biologique ou clinique. Cependant, l'isolement et l'étude des souches constituent une base essentielle pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie : par exemple, il semble exister une influence du génotype et de sa virulence (isolats de génotype I plus virulents) sur la dissémination et la capacité du parasite à passer les barrières biologiques telles que le placenta [pour synthèse : ref. 13, 15 - 17].

Références

- 1) Filisetti, D., *et al.* (2010) Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 29, 665-667.
- 2) Fricker-Hidalgo, H., *et al.* (1996) Congenital toxoplasmosis: specific IgM in fetal blood, cord blood and in the newborn. *Ann Biol Clin (Paris).* 54, 165-8.
- 3) Fricker-Hidalgo, H., *et al.* (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, *in vivo*, and *in vitro* cultures. *Placenta.* 19, 545-9.
- 4) Fricker-Hidalgo, H., *et al.* (2007) Value of *Toxoplasma gondii* detection in one hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 26, 845-6.
- 5) Robert-Gangneux, F., *et al.* (1999) Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *J Clin Microbiol.* 37, 2893-98.
- 6) Robert-Gangneux, F., *et al.* (2010) Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 29, 33-8.
- 7) Bessieres, M.H., *et al.* (2009) Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104, 389-92.
- 8) Cassaing, S., *et al.* (2006) Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 44, 720-24.
- 10) Bessières, M.H., *et al.* (2001) Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of *in utero* treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 94, 37- 45.
- 11) Naessens, A., *et al.* (1999) Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: a multicenter evaluation. *J Pediatr.* 135: 714-19.
- 12) Pratlong, F., *et al.* Highly sensitive molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis gives a novel interest to predictive values. Article soumis.
- 13) Robert-Gangneux, F., *et al.* (2011) The placenta : a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* Sous presse.
- 14) Desmonts, G., Couvreur, J. (1974) L'isolement du parasite dans la toxoplasmose congénitale. *Arch Franç Ped.* 34, 157-66.
- 15) Barragan, A., Sibley, L.D. (2003) Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 11, 426-30.
- 16) Ajzenberg, D., *et al.* (2002) Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis.* 186, 684-9.
- 17) Delhaes, L., *et al.* (2010) Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenat Diagn.* 30, 902-5.