



UNIVERSITE CADI AYYAD

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

MARRAKECH

Année 2007

Thèse N° 13

PRELEVEMENTS FŒTAUX DANS LE DIAGNOSTIC PRENATAL

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE:.....2007

PAR

Mlle Sanaa ALADLOUNI

Né le 03/09/1980 à Marrakech

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLES :

**Diagnostic prénatal-Prélèvements fœtaux-Amniocentèse-Choriocentèse-
Cordocentèse**

JURY

M.	A. SOUMMANI	PRESIDENT
	Professeur de gynécologie-obstétrique	
M.	H. ABBASSI	
	Professeur de gynécologie-obstétrique	RAPPORTEUR
M.	M. SBIHI	
	Professeur de pédiatrie	
M.	S. AIT BEN ALI	
	Professeur de Neurochirurgie	
M.	M. ABOUSSAD	
	Professeur de pédiatrie	
M	B. BELAABIDIA	
	PProfesseur d'anapathologie	

} JUGES

UNIVERSITE CADI AYYAD
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

MARRAKECH

DOYENS HONORAIRES : Pr. MEHADJI Badie-azzaman

VICE DOYENS HONORAIRES : Pr. FADOUACH Sabah
: Pr. AIT BEN ALI Said

ADMINISTRATION

DOYEN : Pr. Abdelhaq ALAOUI YAZIDI

VICE DOYEN : Pr. Najib BOURAS

PROFESSEURS D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

Pr. ALAOUI YAZIDI	Abdelhaq	Pneumo- Phtisiologie
Pr. ABBASSI	Hassan	Gynécologie-Obstétrique
Pr. ABOUSSAD	Abdelmounaim	Pédiatrie
Pr. AIT BEN ALI	Said	Neurochirurgie
Pr. BOUSKRAOUI	Mohamed	Pédiatrie
Pr. EL IDRISSI DAFALI	My Abdelhamid	Chirurgie Générale
Pr. ESSADKI	Boubker	Traumatologie
Pr. FIKRY	Tarik	Traumatologie
Pr. KRATI	Khadija	Gastro -entérologie
Pr. OUSEHAL	Ahmed	Radiologie
Pr. RAJI	Abdelaziz	Oto –Rhino- Laryngologie
Pr. SBIHI	Mohamed	Pédiatrie
Pr. SOUMMANI	Abderraouf	Gynécologie-Obstétrique

PROFESSEURS AGREGES

Pr. AMAL	Said	Dermatologie
Pr. ASRI	Fatima	Psychiatrie
Pr. ASMOUKI	Hamid	Gynécologie –Obstétrique
Pr. BELAABIDIA	Badia	Anatomie – Pathologique
Pr. BEN ELKHAIAT	Ridouan	Chirurgie générale
Pr. BOURAS	Najib	Radiothérapie
Pr. CHABAA	Laila	Biochimie
Pr. EL HASSANI	Selma	Rhumatologie
Pr. ESSAADOUNI	Lamiaa	Médecine Interne
Pr. FINECH	Benasser	Chirurgie Générale
Pr. GUENNOUN	Nezha	Gastro- Entérologie
Pr. KISSANI	Najib	Neurologie
Pr. LATIFI	Mohamed	Traumatologie- orthopédie
Pr. MOUDOUNI	Said mohammed	Urologie
Pr. MOUTAOUAKIL	Abdeljalil	Ophtalmologie
Pr. TAZI	Imane	Psychiatrie
Pr. SARF	IsamaiL	Urologie

PROFESSEURS ASSISTANTS

Pr. ABOULFALAH	Abderrahim	Gynécologie-Obstétrique
Pr. AKHDARI	Nadia	Dermatologie
Pr. AIT SAB	Imane	Pédiatrie
Pr. AMINE	Mohamed	Epidémiologie-clinique
Pr. BOUMZEBRA	Drissi	Chirurgie- Cardio –Vasculaire
Pr. BOURROUS	Mounir	Pédiatrie
Pr. DAHAMI	Zakaria	Urologie
Pr. EL ADIB	Ahmed rhassane	Anesthésie- Réanimation
Pr. EL ATTAR	Hicham	Anatomie Pathologique
Pr. EL HATTAOUI	Mustapha	Cardiologie
Pr. EL HOUDZI	Jamila	Pédiatrie
Pr. EL FEZZAZI	Redouane	Chirurgie pédiatrique
Pr. ETTALBI	Saloua	Chirurgie réparatrice
Pr. GHANNANE	Houssine	Neurochirurgie
Pr. LOUZI	Abdelouahed	Chirurgie- Générale
Pr. LMEJJATI	Mohamed	Neurochirurgie
Pr. MAHMAL	Aziz	Pneumo Phtisiologie
Pr. MAHMAL	Lahoucine	Hématologie Clinique
Pr. MANOUDI	Fatiha	Psychiatrie
Pr. NAJEB	Youssef	Traumatologie –orthopédie
Pr. NEJMI	Hicham	Anesthésie- Réanimation
Pr. OULAD SAIAD	Mohamed	Chirurgie Pédiatrique
Pr. SAMKAOUI	Mohamed abdenasser	Anesthésie- Réanimation
Pr. TAHRI JOUTEI HASSANI	Ali	Radiothérapie
Pr. TASSI	Nora	Maladies infectieuses
Pr. SAIDI	Halim	Traumatologie- orthopédie
Pr. YOUNOUS	Said	Anesthésie- Réanimation
Pr. ZOUGARI	Laila	Parasitologie-Mycologie

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سُبْحَانَكَ عَلِيمُنَا إِلَهِ

مَا عَلِمْنَا أَنَّكَ الْعَلِيمُ

الْكَبِيرُ

بِإِذْنِ اللَّهِ
الْعَظِيمِ

قَسَمُ الطَّبِيبِ

اقسِمُ بِاللّٰهِ الْعَظِيمِ

أَنْ أَرَأَقِبَ اللّٰهَ فِي مِهْنَتِي .

وَأَنْ أَصُونَ حَيَاةَ الْإِنْسَانِ فِي كَافَّةِ أَدْوَارِهَا فِي كُلِّ الظُّرُوفِ وَالْأَحْوَالِ بِإِذْنِ اللَّهِ وَسَعْيِي فِي اسْتِنْقَازِهَا مِنَ الْهَلَاكِ وَالْمَرَضِ وَالْأَلَمِ وَالْقَلْقِ .

وَأَنْ أَحْفَظَ لِلنَّاسِ كِرَامَتَهُمْ، وَأَسْتُرَ عَوْرَتَهُمْ، وَأَكْتُمَ سِرَّهُمْ .

وَأَنْ أَكُونَ عَلَى الدَّوَامِ مِنْ وَسَائِلِ رَحْمَةِ اللَّهِ، بِإِذْنِ اللَّهِ رِعَايَتِي الطَّبِيبَةَ الْقَرِيبَ وَالْبَعِيدَ، لِلصَّالِحِ وَالْخَاطِئِ، وَالصَّدِيقِ وَالْعَدُوِّ .

وَأَنْ أَثَابِرَ عَلَى طَلَبِ الْعِلْمِ، أَسْخِرَهُ لِنَفْعِ الْإِنْسَانِ.. لَا لِأَذَاهِ .

وَأَنْ أُؤَقِّرَ مَنْ عَلَّمَنِي، وَأُعَلِّمَ مَنْ يَصْغُرَنِي، وَأَكُونَ أَخًا لِكُلِّ زَمِيلٍ فِي الْمِهْنَةِ الطَّبِيبَةِ مُتَعَاوِنِينَ عَلَى الْبِرِّ وَالتَّقْوَى .

وَأَنْ تَكُونَ حَيَاتِي مِصْدَاقَ إِيمَانِي فِي سِرِّي وَعَلَانِيَتِي ، نَقِيَّةً مِمَّا يُشِينُهَا تَجَاهَ اللَّهِ وَرَسُولِهِ وَالْمُؤْمِنِينَ .

وَاللّٰهُ عَلَى مَا أَقُولُ شَهِيدٌ

JE DEDIE CETTE THESE

A mon très cher papa :

Cette thèse représente l'aboutissement de longues années d'études pendant lesquelles tu as été plus que présent ; tu as été source d'encouragement, de support et d'inspiration.

Confiant en mes jugements et respectueux de mes choix, c'est grâce à toi que j'ai pu réaliser aujourd'hui un de tes rêves les plus chers : devenir médecin.

Papa, cette thèse, je te la dédie.

A ma très chère maman :

Ton écoute, ton soutien et ta patience sans limites sont les piliers de ma réussite et de mon épanouissement personnel. Patiente et présente à tout moment de ma vie, tu es bien plus qu'une confidente. Toi qui t'es toujours sacrifiée pour élever tes enfants avec beaucoup d'amour.

Maman, considère cette thèse comme le fruit de tes efforts.

A mon Frère Younes

Tes conseils et ton soutien ont fait de toi mon confident dans les moments les plus difficiles de ma vie. J'ai reconnu en toi une sincérité et un réconfort à toute épreuve. Mon admiration pour toi a été source de motivation, d'inspiration et de persévérance.

Younes, merci.

A mon Frère Amine

Nos moments sont ponctués souvent de rires, rarement de disputes, mais jamais d'ennui. C'est dans ces moments que je trouve l'énergie et l'équilibre de mes ambitions.

Amine, merci

A Mes Oncles et Tantes

Abdelouhab et naima, Aicha et abdellah , Abdelkrim et assia, Abderhman, Abdelhamid et labiba, Safi et amal, Lalla Aicha et haj abdelmajid, Aama et aamou, Fatim zohra.

A Mes Grands-parents

A Mes cousins et cousines

Ghita, korrah, Akram, Achraf, Yousr, hatim, Ghali, Yousra, Anwar, Anas, Aiman, Soufiane, Amal, Mounir, hayat, Moncef, Abdelhak, Fouad, Nadia, Salwa, Ali, hanane, Hind, Fadwa...

A Mes Ami(e)s

Amina, Kamal, Nawel, Imane, Karim, Mhamed, Meriem, Karima, Loubna, Amine, Simo, Imad, Salwa, Simo, Farah, Samiha, Badr, Amal, Fatiha, Yassine, Meriem, Wafa, Loubna, Mariama, Mohamed, Hafsa, Hanane, Najib, Hind, Amir, Hakim, mouatassim, abdessamad, mourad, hicham...

A Toute l'équipe du CHU Pitié-Salpêtrière

Pr Dommergues, Pr Piette, Pr Saillant, Pr Chigot, Pr Bricaire, Pr Lazennec, Alexis Nogier, Philippe Bossi, Karine Guez....

A quelques collègues qui m'ont beaucoup soutenue

Rachid Amrani, Simo Boubrik, Younes Benfdil, Soufiane Elhallani, Nadia Tazi, Mehdi Elfakiri, karima jiddi, Nabil Berrada...

Et à Toutes celles et Tous ceux qui font partie de ma vie...

REMERCIEMENTS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le professeur SOUMMANI

Professeur agrégé de gynécologie obstétrique

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Je vous remercie pour votre enseignement permanent, rigoureux et précis et de votre disponibilité envers vos étudiants.

A NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE

Monsieur le professeur ABBASSI

Professeur agrégé de gynécologie obstétrique

Je vous remercie de m'avoir confié ce sujet de thèse.

Vous avez en permanence suscité mon admiration par votre ardeur et votre amour pour l'exercice de la profession.

Qu'il me soit permis d'exprimer ici ma reconnaissance et mon profond respect.

A NOTRE MAITRE ET MEMBRE DE JURY

Monsieur le professeur ABOUSSAD

Professeur agrégé de pédiatrie

Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites en siégeant dans ce jury. Veuillez accepter, cher maître, mon sincère respect.

A NOTRE MAITRE ET MEMEBRE DE JURY

Monsieur le professeur SBIHI

Professeur agrégé de pédiatrie

Je vous remercie de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Que votre sérieux, votre compétence et votre rigueur de travail soient pour moi un exemple.

Veuillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de mon grand respect

A NOTRE MAITRE ET MEMBRE DE JURY

Mr le professeur AIT BEN ALI

Professeur agrégé de neurochirurgie

J'ai eu la chance de bénéficier de votre enseignement au cours de mes études médicales.

Votre rigueur et votre dynamisme m'ont toujours impressionnés.

Veuillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de ma profonde considération et de mon sincère respect.

A NOTRE MAITRE ET MEMBRE DE JURY

Mme le professeur BELAABIDIA

Professeur agrégé d'anapathologie

Je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse.

J'ai beaucoup apprécié la qualité de votre enseignement au cours de mes études à la faculté de médecine

Qu'il me soit permis d'exprimer ici ma reconnaissance et mon profond respect.

A NOTRE MAITRE

Monsieur le professeur ABOULFALAH

Professeur assistant de gynécologie obstétrique

Votre passion pour la médecine fœtale m'a fasciné tout au long de ce travail, ou vous avez su me faire découvrir par votre dynamisme intellectuel un domaine auquel je ne pouvais accéder.

Votre aide dans l'élaboration de ce travail m'a été précieuse.

J'ai eu la chance d'apprendre continuellement de vous au cours de ma formation.

Je vous remercie et vous assure ici ma profonde reconnaissance et admiration.

ABREVIATIONS

DPN	: diagnostic prénatal
T21	: trisomie 21
T13	: trisomie 13
T18	: trisomie 18
MSM	: marqueurs sériques maternels
hCG	: hormone chorio gonadique
αFP	: alpha foeto proteine
IMG	: interruption médicale de grossesse
PVC	: prélèvements de villosités choriales
DFN	: défaut de fermeture du tube neural
VPP	: valeur prédictive positive
CN	: clarté nucale
LCC	: longueur cranio caudale
RCIU	: retard de croissance intra-utérin
PSF	: ponction de sang fœtal
PCR	: polymerase chain reaction
CMV	: cytomégalovirus
ADN	: acide desoxyribo nucléique
CGH	: hybridation génomique comparative
FISH	: fluorescent hybridazion in situ
ETIU	: exanguino transfusion in utéro
IVG	: interruption volontaire de grossesse
IgM	: Immunoglobulines M
LDH	: lactico déshydrogénase
PF	: perte foetale

PLAN

INTRODUCTION	1
INDICATIONS	4
I– Les anomalies chromosomiques	5
1– L’âge maternel	6
2– Les marqueurs sériques maternels	8
3– La clarté nucale.....	17
4– Antécédent d’enfant porteur d’anomalie chromosomique non héritée.....	23
5– Parent porteur d’un remaniement chromosomique	24
6– Les signes d’appel échographiques	24
II– Les maladies géniques	33
1– Introduction	33
2– Dépistage des maladies génétiques dans les familles à risque	33
3– Dépistage des maladies génétiques sur signes échographiques	35
III– Les maladies infectieuses	38
1– Toxoplasmose.....	39
2– Cytomégalovirus	40
3– Rubéole	41
4– Varicelle	42
5– Parvovirus	43
TECHNIQUES	46
I– L’amniocentèse	47
1– Bases physiologiques	47
2– Terme	49
3– Matériel	50
4– Technique opératoire	50
5– Compte rendu	52
6– Contre-indication	52
7– Cas particulier	53
8– Echec de ponction	55
9– Echec de culture	56
10– Conclusion	57
II– Choriocentèse	58
1– Définition	58
2– Rappels embryologiques.....	58
3–base physiologique	59
4– Terme	60
5– Matériel	60
6– Technique	60
7– Avantage du PVC	62
8– PVC transabdominal VS PVC transcervical	63

9– Problème rencontrés en cytogénétique	64
10– Conclusion	65
III– Cordocentèse	66
1– Définition	66
2– Historique	66
3– Matériel	67
4– Terme	68
5– Technique	68
6– Limites	70
7– Préalable à l'analyse de tout résultat : le contrôle de la pureté du sang fœtal	71
IV– Prélèvements rares	72
1– Urine fœtale	72
2– Epanchement des séreuses	73
3– Peau fœtale	73
COMPLICATIONS.....	74
I– Amniocentèse	75
1– Les complications maternelles	75
2– Les complications fœtales	77
II– Choriocentèse	82
1– Les complications maternelles	82
2– Les complications fœtales	83
III– Les choix des armes : le choix entre amniocentèse et choriocentèse	85
IV– Cordocentèse	87
OUTILS D'ANALYSE DES PRELEVEMENTS	90
I– La cytogénétique classique ou conventionnelle	91
1– Prélèvements	92
2– Techniques de préparation chromosomiques	93
II– La cytogénétique moléculaire	99
1– Outils et stratégies de la génétique moléculaire	99
2– Les prélèvements fœtaux et la génétique moléculaire	103
3– La polymérase chain reaction	107
4– Hybridation in situ fluorescente.....	111
5– Le caryotype en multi fluorescence	119
6– Hybridation génomique comparative.....	120
7– CGH microarray	122
8– La PCR quantitative	125
III– Biochimie prénatale	127
1– Le dosage de l'αFP dans le liquide amniotique	127
2– Electrophorèse des cholinestérases du liquide amniotique	127
3– Diagnostic de maladies métaboliques.....	128

4– Enzymes digestives du liquide amniotique	128
5– Dosage de la bilirubine fœtale	128
6– Biochimie rénale fœtale	130
IV– Infectiologie prénatale	131
1– La toxoplasmose	131
2– Les infections virales	131
CONSEQUENCES OBSTETRIQUES ET PEDIATRIQUES DU DPN.....	134
I– Présentation générale des options	135
II– Traitements in utero	135
1– Traitement de la pathologie rhésus	135
2– Pose de drains foeto-amniotiques	136
3– Traitement des infections fœtales	136
III– Interruption médicale de grossesse	138
1– La technique du foeticide	139
ASPECTS ECONOMIQUES ETHIQUES ET PSYCHOSOCIAUX DU DPN..	140
I– Aspects économiques.....	141
1– Critères du dépistage	141
2– Travaux d'évaluation économique	142
II– Aspects psychologiques	143
1– Circonstances du diagnostic	143
2– Annonce du diagnostic d'une maladie génétique	144
III– Aspects éthiques	144
1– Modalités d'organisation du diagnostic prénatal	145
2– Aspects légaux de l'interruption médicale de grossesse.....	145
3– Enjeux éthiques	147
PERSPECTIVES D'AVENIR.....	148
I– Présence de cellules fœtales dans le sang maternel	149
1– Historique	149
2– Isolement des cellules fœtales	149
3– Culture des cellules fœtales.....	150
4– Limites des cellules fœtales	150
II– Présence d'ADN fœtal libre dans le sang maternel	151
1– Physiopathologie	151
2– Techniques d'extractions.....	151
3– Limites	151
4– Applications diagnostiques	152
III– Le diagnostic préimplantatoire	152
1– Définition	152
2– Indication	152

3– Avantages et limites	153
Conclusion	155
Bibliographie	158
Résumés	

INTRODUCTION

Le diagnostic prénatal (DPN) est devenu en moins de 20 ans une spécialité à part de la Gynécologie-Obstétrique.

Au début des années 1970, la découverte d'une malformation était le plus souvent une mauvaise surprise lors de l'accouchement. Les anomalies chromosomiques, les maladies génétiques, les embryo-foetopathies n'étaient découvertes que plus ou moins tardivement après la naissance [1].

Le conseil génétique via les théories Mendéliennes n'autorisait aux couples considérés à risque (car porteurs ou transmetteurs d'une anomalie chromosomique ou d'une maladie génique) qu'une estimation de risque en cas de nouvelle grossesse [2].

Aujourd'hui, l'avènement du DPN a fondamentalement bouleversé la situation.

Le DPN s'entend des pratiques médicales ayant pour but de détecter in utéro chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité.

Réalisable depuis les années soixante, il n'est devenu pratique courante qu'au cours des trois dernières décennies. Il répond ainsi au besoin d'identifier tôt durant la grossesse un certain nombre d'anomalies fœtales ou maladies génétiques [3].

Les techniques de prélèvement foetaux se sont diversifiées et conjointement, se sont développés des techniques de laboratoire de plus en plus élaborées, qu'il s'agisse de biochimie, de cytogénétique ou de biologie moléculaire, dont l'application nécessite une étroite collaboration entre les divers praticiens impliqués [4].

La décision de réaliser un prélèvement fœtal doit être étudiée au cas par cas et tient compte de l'analyse du rapport bénéfice-risque. Le choix de la technique dépend essentiellement de deux éléments : l'indication et le terme [5].

La question du DPN dans le contexte marocain est en perpétuel remaniement : nous ne disposons pas encore actuellement de textes de loi qui régissent ce domaine et par là, nombre d'incertitudes persistent sur sa pratique actuelle : anarchisme et malorganisation restent à la base des pratiques. A cela s'ajoute une certaine spécificité socio-culturelle et économique et qui pose des problèmes d'ordre essentiellement éthique. Enfin, face à cette polémique, la demande des femmes se fait de plus en plus grandissante.

Pour faire le point sur ces avancées, cette revue de littérature traitera des indications des prélèvements fœtaux, les techniques actuellement utilisées et les complications respectives. Puis seront abordées les conséquences obstétricales et pédiatriques.

Enfin cette revue traitera des aspects éthiques, psychosociaux et économiques du diagnostic prénatal pour terminer sur les nouvelles perspectives d'avenir : L'ADN fœtal dans le sang maternel [6] et le diagnostic préimplantatoire (DPI) [7].

LES INDICATIONS

Les pathologies justifiant d'un DPN sont celles qui sont responsables de tableaux bruyants mettant en cause le pronostic vital et ou fonctionnel de l'enfant.

Trois grands groupes peuvent être différenciés :

- Les aberrations chromosomiques qui sont les plus fréquentes
- Les maladies géniques
- Les maladies infectieuses

LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

Les anomalies chromosomiques sont responsables des 2/3 des avortements spontanés du 1^{er} trimestre, de 8% des morts fœtales in utero et de 5% des enfants mort-nés [8]. Un enfant sur cinq est porteur d'une anomalie chromosomique à la naissance. Les trisomies autosomales 13, 18, 21 et les anomalies de nombre des chromosomes sexuels représentent près de 95% des anomalies chromosomiques responsables d'un syndrome clinique à la naissance [9].

Le dépistage des anomalies chromosomiques fœtales est pratiqué depuis 1972 dans de nombreux pays [10]. Initialement réservé aux femmes à haut risque en raison des complications potentielles des méthodes de prélèvement des cellules fœtales, du nombre insuffisant des laboratoires de cytogénétique et du coût élevé des examens, le DPN des aberrations chromosomiques s'est rapidement répandu à la population générale grâce à des politiques de dépistage systématique adopté par la majorité des pays développés [11]. Ces politiques de dépistage reposent essentiellement sur le dépistage de la Trisomie 21(T21), maladie chromosomique la plus fréquente (1/750 naissances) et qui reste une des premières causes de handicap mental et psycho moteur important dans l'enfance [12]. Les trisomies 13 et 18 sont beaucoup plus rares, avec une incidence de 1/4000 à 1/10000 pour la trisomie 13 et 1/8000 naissances pour la trisomie 18 [12]. La monosomie X ou syndrome de Turner est retrouvée chez 4 filles pour 10000 nouveaux nés. La triploïdie X et le syndrome de klinefelter sont les 2 autres anomalies des chromosomes sexuels les plus souvent rencontrés à la naissance [12].

Dès le milieu des années 1970, tous les pays développés ont proposé l'accès au DPN chromosomique pour les groupes dits à « haut risque », c'est à dire pour les femmes âgées de plus de 35 ou 38 ans selon les pays [10].

Avec l'arrivée de l'imagerie fœtale au cours des années 1980, un nouveau groupe à risque a pu être défini, celui des fœtus présentant une anomalie du développement documentée par échographie. Cependant la sensibilité de l'examen était loin d'être à 100% et dépendante de la machine et de l'opérateur, cette nouvelle stratégie ne pouvait devenir une méthode de dépistage [13].

La découverte des marqueurs sériques maternels (MSM) en 1979 permit, elle, d'envisager un dépistage en population des femmes à risque élevé, auxquelles un DPN pouvait être ainsi proposé [14].

Depuis quelques années, la mesure de la clarté nucale (CN) par échographie peut également prétendre au statut d'examen de dépistage systématique des anomalies chromosomiques [15].

Ces trois approches de l'identification d'un groupe à haut risque, fondées sur le critère d'âge maternel, d'anomalies échographiques et de MSM perturbés, vont maintenant être présentés en détail.

L'âge maternel

La relation entre aberrations chromosomiques et âge maternel est bien établie et elle est à l'origine du dépistage basé sur l'âge maternel [16]. L'effet de l'âge fut documenté initialement par Coulson en 1933 [17]. Des études épidémiologiques ultérieures ont confirmé cette observation et ont permis d'estimer le risque pour chaque année de vie reproductive [18,19], comme le montre le tableau 1.

Ce risque accru serait dû en partie au vieillissement ovulaire et concerne particulièrement la T21 qui est la plus fréquente des anomalies autosomiques observées. Plusieurs autres, dont les trisomies 13 et 18, et les anomalies des chromosomes sexuels XXY et XXX sont également diagnostiquées plus fréquemment dans ce groupe d'âge maternel.

Tableau 1 : Risque de T 21 par année d'âge maternel, au 2^{ème} trimestre de grossesse et à la naissance [20]

Age maternel	Risque à la naissance	Risque au 2 ^{ème} trimestre
15	1/1587	1/1301
20	1/1538	1/1261
25	1/1351	1/1107
30	1/909	1/745
35	1/381	1/312
38	1/187	1/153
40	1/111	1/91
45	1/28	1/23
50	1/7	1/6

Le risque augmente lentement avec l'âge maternel jusqu'à la moitié de la trentaine, après quoi il augmente plus rapidement à chaque année. À 40 ans le risque atteint 1/111 comparativement à 1/384 à 35 ans et 1/909 à 30 ans.

Le risque est plus grand s'il est calculé au 2^{ème} trimestre de la grossesse, moment où on pratique généralement l'amniocentèse, puisqu'on observe un taux d'environ 23 % de perte foetale spontanée des foetus atteints entre le deuxième trimestre et le terme [21].

Collectivement, chez les femmes âgées de 35 ans et plus, le risque moyen de T21 est de 1 sur 150 (0,67%) vers la moitié de la grossesse, c'est-à-dire qu'un cas de T21 est détectable pour chaque 150 amniocentèses pratiquées chez les femmes dans ce groupe d'âge [22].

C'est ainsi que tous les pays européens ont adopté dès la fin des années 1970 une politique de dépistage basée sur la proposition d'amniocentèse ou de choriocentèse à toute femme âgée de 35 ans et plus; la limite choisie est de 38 ans en France et dans d'autres pays européens tels que l'Espagne, l'Italie, la Norvège [23], de 36 ans aux Pays bas et de 35 ans aux Etats-Unis et au Canada [24,25]. Ce seuil a été fixé en considérant qu'à l'âge de 38

ans le risque de perte foetale associé aux interventions diagnostiques est à peu près équivalent au risque de donner naissance à un enfant trisomique.

Mais le DPN basé sur l'âge maternel comporte des limites. Etant donné que les femmes de 38 ans et plus ne représente que 3,8% des femmes enceintes [26], cette politique de dépistage a entraîné un taux de détection de seulement 25%.

Les femmes jeunes ont individuellement moins de risque de concevoir un enfant trisomique, mais elles sont les plus nombreuses. De ce fait, 75% des enfants trisomiques naissent de mères âgées de moins de 38 ans et ne sont donc pas détectées par cette politique [27].

C'est pourquoi d'autres stratégies de dépistage ont été développées. L'introduction des MSM dans le dépistage de la T21 a permis de corriger progressivement ces inégalités.

Rappelons que, pour un âge maternel bas, c'est à dire pour les femmes âgées de moins de 16 ans, Il n'y a pas d'indication à la réalisation d'un caryotype fœtal chez une femme âgée de moins de 16ans [28].

Les Marqueurs sériques maternels

2-1 Introduction

L'introduction du dépistage par les MSM a permis d'étendre le dépistage aux femmes de moins de 38 ans et d'offrir à celles de 38 ans et plus la possibilité de fonder leur décision sur une évaluation affinée de leur risque, évitant ainsi un certain nombre d'amniocentèses abusives. On peut ainsi dire que cette approche a conduit à réduire les inégalités entre les femmes dites " jeunes " et " âgées ", toutes pouvant bénéficier, si elles le souhaitent, d'une évaluation individuelle de leur risque. Le dépistage par MSM est largement effectué aujourd'hui. Actuellement, plus de 75% des femmes y ont recours en France [14].

Les MSM sont des protéines normales en circulation maternelle et dont la mesure permet de dépister un certain nombre de pathologies fœtales au début de la grossesse [29].

2-2 Principe

La mesure des MSM se fait dans le sérum maternel entre 15 et 17 SA. Des logiciels de calcul sont utilisés pour estimer un risque individuel de T21 :

–Le point de départ est le risque lié à l'âge maternel qui sera pondéré par un facteur lié aux MSM.

–La combinaison risque lié à l'âge maternel et risque lié aux MSM conduit au calcul d'un calcul d'un risque individuel de T21.

–Le modèle mathématique est fondé sur la comparaison de deux populations, une population avec T21 fœtale et une population de femmes enceintes d'un enfant non atteint. Il repose sur le rapport de vraisemblance ou likelihood ratio (figure 1) [30].

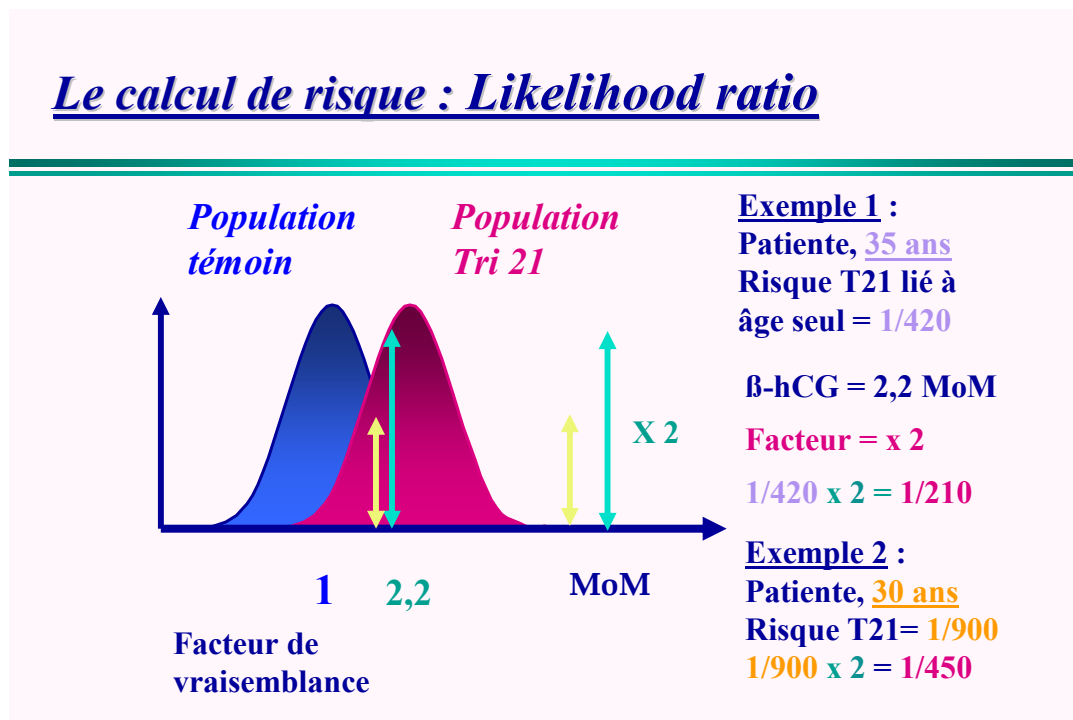


Figure 1 : likelihood ratio

A partir du logiciel de calcul, un risque de T21 est ainsi calculé pour chaque patiente.

Un seuil de risque a été choisi à $1/250$ (c'est le risque d'une patiente de 38 ans)

Il y'aura donc deux populations de patientes, celles à risque $> 1/250$ et celles à risque plus faible.

Une amniocentèse pour caryotype fœtal est proposée aux patientes à risque.

Le seuil de 1/250 permet d'atteindre un taux de détection de 60–65 % [14] au prix de 5 % d'amniocentèse [31].

Si on plaçait le seuil à 1/300 par exemple, on augmenterait le taux de détection de la T21, mais on augmenterait aussi le taux d'amniocentèses générées.

En théorie, plus le nombre de marqueurs testés augmente, meilleures sont les performances. En effet, si on fixe à 5 % le taux de dépistages positifs, le taux de détection varie de 36 à 49 % en utilisant un seul marqueur combiné avec l'âge maternel, alors qu'il atteint 63 à 68 % lorsque quatre marqueurs sont utilisés.

2-3 Les MSM : rôle et cinétique

Les MSM sont maintenant de pratique courante dans la plupart des pays mais les mécanismes physiopathologiques qui régissent leurs modifications restent inexpliqués.

Les plus utilisés sont les marqueurs du 2^{ème} trimestre, mais il existe des marqueurs du 1^{er} trimestre.

a- Les MSM du 2^{ème} trimestre

Quatre molécules ont un intérêt pour le dépistage des anomalies chromosomiques au 2^{ème} trimestre : L' α FP, L'HCG, l'inhibine et l'oestriol :

–L' α FP (Alpha Foeto Proteine) est synthétisée par le foie fœtal, son abaissement en cas de T21 reste incompris.

–L'hCG (Hormone Chorio Gonadique) est synthétisée par le placenta. Elle augmente rapidement au cours du 1^{er} trimestre avec un pic à 9–10 semaines suivi d'une chute rapide puis d'un plateau de 20 semaines à la fin de la grossesse [32].

–L'oestriol est une hormone stéroïde produite par le syncytiotrophoblaste, la couche placentaire en contact direct avec la circulation maternelle [33]. Sa fraction non conjuguée est un produit placentaire dérivé des précurseurs au niveau du foie et de la glande surrénale du fœtus [34].

–L'inhibine est une hormone glycoprotéique sécrétée sous multiples formes, incluant la sous unité α et deux hétérodimères : α/β -A (inhibine A) et α/β -B (inhibine B). L'inhibine totale inclut l'inhibine A, l'inhibine B et les sous-unités α [35].

b- Les MSM du 1^{er} trimestre

Deux marqueurs sont actuellement retenus comme efficaces, la PAPP-A (pregnancy associated placental protein of type A) [36] plus performante à 10 SA et la sous unité β libre de l'hCG recherchée à 12-13SA.

- La PAPP-A :

La PAPP-A est une glycoprotéine tétramérique, de 1547 acides aminés, constituée d'un complexe équimolaire du monomère PAPP-A et du précurseur de la protéine basique majeure du polynucléaire éosinophile. Elle est synthétisée principalement par le syncytiotrophoblaste et la cellule déciduale. Elle peut être détectée dans le sang maternel à partir de la 5^{ème} semaine de grossesse et aurait un rôle protecteur du fœtus vis-à-vis du système immunitaire maternel [37]. En cas de T21, il y aurait des anomalies de la glycosylation de la molécule, associées à une perturbation de son transfert placentaire et de sa sécrétion ainsi qu'une diminution de sa stabilité, d'où un effondrement des concentrations plasmatiques maternelles [38,39].

Exprimé en MoM, l'abaissement est plus important lorsque les dosages sont effectués précocement [40].

- La fraction libre de la β hCG

Wald [41] a montré que la médiane des concentrations de β hCG libre en cas de T21 est égale à 1,79 fois la valeur de la médiane normale (cette valeur est de 2,4 pour un dépistage au 2^{ème} trimestre). L'augmentation des concentrations sériques de la sous unité Libre de l'hCG semble être le fait soit d'une augmentation de la transcription, soit d'une modification de la glycolyse de la chaîne α et par voie de conséquence de la demi-vie de la molécule.

Les études rétrospectives montrent que l'association PAPP-A, β hCG libre est la plus efficace, conduisant aux mêmes performances qu'au 2^{ème} trimestre avec 60 % de taux de détection pour 5 % d'amniocentèses [42].

Mais, la réalisation plus précoce du dépistage de la T21 permettrait un diagnostic d'anomalie chromosomique dès 12-13 semaines, ce qui présente des intérêts médicaux et

psychologiques évidents. Ces avantages doivent cependant être pondérés par les aspects techniques concernant le prélèvement foetal précoce pour la réalisation du caryotype.

c- performance du dépistage par les MSM du 2^{ème} trimestre

Les MSM ont fait l'objet de nombreuses publications dont les résultats bruts ne sont pas toujours comparables. En effet, la structure d'âge maternel des populations testées ainsi que le seuil de risque auquel une amniocentèse est proposée influent sur les performances du dépistage.

En théorie, plus le nombre de marqueurs testés augmente, meilleurs sont les performances.

En effet, si on fixe à 5% le taux de dépistages positifs, le taux de détection varie de 36 à 49% en utilisant un seul marqueur combiné avec l'âge maternel, alors qu'il atteint 63 à 68% lorsque 4 marqueurs sont utilisés [43], comme le montre la tableau 2.

Tableau 2 : Performances de différentes combinaisons de marqueurs sériques pour un taux de dépistages positifs constant fixé à 5% [41] :

	Taux de détection (%)	Valeur prédictive positive
Age maternel seulement (> 35 ans)	30	1 / 130
Age maternel et un marqueur		
- α FP	3	1 / 105
- β hCG	51	1 / 75
Age maternel et deux marqueurs :		
- α FP, hCG	59	1 / 65
- α FP, β hCG	58	1 / 65
Age maternel et trois marqueurs :		
- α FP, uE3 , hCG	69	1 / 55
- α FP, hCG , inhibin A	68	1 / 55
- α FP, hCG , β hCG	62	1 / 60
Age maternel et quatre marqueurs :		
- α FP , uE3 ,hCG , inhibin A	76	1 / 50
- α FP, α hCG, β hCG, inhibinA	69	1 / 55
-uE3, α hCG, β hCG, inhibinA	73	1 / 55

2-4 Facteurs influençant la distribution des MMS :

La performance des MSM peut théoriquement être amélioré en prenant compte des facteurs qui influent sur la distribution des valeurs.

En pratique l'impact de la prise en compte de l'ensemble de ces facteurs n'a pas été évalué dans des études prospectives en population. Le calcul permet d'espérer un gain de 0,5 à 1% de taux de détection en ajustant chacun de ces facteurs :

Poids maternel :

Les concentrations des MSM varient en fonction du poids maternel à la date du prélèvement. Par exemple, pour une différence de plus de 20kg, le taux d' α FP baisse de 17%, celui d'uE3 de 7% et celui de l'hCG de 16% [44].

C'est pourquoi aujourd'hui tous les logiciels de calcul de risque mis sur le marché en France intègrent le poids maternel dans le calcul de risque.

Diabète :

Après ajustement pour le poids maternel, des études ont conclu que le diabète n'a pas d'influence significative sur les marqueurs sériques [45].

Origine ethnique :

La prise en compte du poids maternel diminue considérablement l'impact des facteurs ethniques sur les marqueurs sériques [46,47]. En France, ce critère n'est actuellement pas pris en compte dans les logiciels de calcul.

Tabagisme :

Le tabagisme a un impact important sur les taux d'hCG et de β hCG libre (-18%) mais nettement plus faible (3 à 4%) sur les concentrations d' α FP et d'oestriol [48]. En France, ce facteur est pris en compte dans la plupart des logiciels. L'impact du tabac sur les marqueurs sériques est indépendant du nombre de cigarettes fumées, il apparaît dès une consommation de une cigarette par jour. Par contre, l'effet du tabagisme passif n'est pas connu.

Grossesses consécutives :

La concentration de hCG semble associée négativement avec la parité. L'effet sur le taux de détection est de 0,1 %. Généralement on n'ajuste pas pour cette variable [49].

2-5 Facteurs influençant le calcul de risque

– Antécédent familial de T21 :

En cas d'antécédent de T21 lors d'une grossesse précédente, le risque de récurrence observé est supérieur de 0,34 % à celui de l'âge maternel [50].

En pratique, en France, une amniocentèse pour caryotype foetal est proposée en 1ère intention à ces patientes. Si les MSM sont proposés avant de décider d'une amniocentèse, ce facteur doit être pris en compte pour le calcul de risque.

En revanche, le dépistage par les MSM n'est pas adapté lorsque la T21 est liée à une translocation familiale car le risque de transmission foetale sur un mode déséquilibré est très important.

– Grossesses gémellaires :

Des incertitudes persistent sur la distribution des MSM dans les grossesses multiples normales. La méthode consiste à « normaliser » les concentrations de marqueurs chez les jumeaux en les divisant par la médiane définie sur une population de grossesses gémellaires témoins, puis à utiliser ces valeurs normalisées dans des logiciels qui ont été calibrés pour des grossesses monofoetales. La distribution de l'hCG varie en fonction de la chorionicité, aussi la prise en compte de ce facteur améliore la spécificité du dépistage [51].

Au total, les MSM :

- permettent d'éviter les amniocentèses inutiles :

Chez les patientes âgées de 35–37 ans.

Chez les patientes de 38 ans et plus qui le souhaitent.

- ont quasiment supprimé les amniocentèses « pour convenance »
- permettent le diagnostic de T21 chez les femmes jeunes

2-6 Résultats

a-Dépistage de la T 21 par les MMS [41] :

- Patientes de moins de 38 ans 165

Au cours de l'année 1997, 1ère année en France de mise en place du dépistage de la T21 par les MSM, 52 % des femmes enceintes ont choisi de faire pratiquer les dosages.

Au total, 6,08 % amniocentèses ont été induites chez les femmes de moins de 38 ans, permettant de déceler 318 des 443 cas de T21, soit 72 % de taux de dépistage. La valeur prédictive positive (VPP) des marqueurs sériques était, pour l'année 1997, de 1/71 (une T21 dépistée pour 71 caryotypes réalisés). En 1998, 56 % des femmes enceintes ont bénéficié du dépistage, induisant 6,33% d'amniocentèses et permettant de déceler 408 cas de T21. La VPP des MSM était, pour l'année 1998, de 1/90. Entre 1999 et 2001, 75% des femmes ont eu recours au dépistage par les marqueurs permettant un taux de couverture qui a progressé de 54 % à 80 % [41].

On remarque donc que l'adhésion des médecins et des patientes a été très forte dès la 1^{ère} année.

–patientes de plus de 38 ans

Les MSM peuvent également être utilisés chez les patientes de 38 ans et plus qui ne souhaitent pas une amniocentèse en 1^{ère} intention.

Entre 1997 et 2001, ce dépistage a concerné 20 % des grossesses après 38 ans. Seul 1/3 de ces patientes présentait un risque $> 1/250$, permettant ainsi d'éviter une amniocentèse dans 2/3 des cas, avec un taux de dépistage de la T21 de 95%.

b-Dépistage d'autres anomalies par les MSM :

– *Dépistage des DFN :*

Environ 80% des femmes enceintes dont le futur enfant est porteur d'un DFN ont un taux d' α FP sérique $> 2,5\text{MoM}$ c'est-à-dire $>99^{\text{e}}$ percentile [41].

–*Dépistage de la trisomie 18 (T18)*

Au plan biochimique, la T18 se caractérise par un profil associant des taux bas d'hCG, α FP, et de PAPPA.

Une stratégie de calcul de risque fondée sur la combinaison âge maternel, hCG, α FP, aurait l'inconvénient de faire pratiquer un grand nombre d'amniocentèses pour reconnaître une polymalformation par ailleurs visible à l'échographie.

C'est pourquoi le consensus est de recommander la réalisation d'une échographie orientée quand les taux d'hCG et d' α FP sont $<0,5\text{MoM}$. Environ 60 % des cas de T18 pourraient ainsi être décelés [41].

2-7 Conclusion

Les études prospectives réalisées en France ont montré que les MSM proposés à la population des femmes enceintes permettent de dépister au moins 60 % des femmes enceintes attendant un enfant atteint de T21 au prix de 5 % d'amniocentèses induites. Ce test permet le dépistage de la T21 chez les femmes jeunes et non plus seulement chez les

femmes les plus âgées. Il peut être également utilisé chez les patientes de 38–40 ans qui ne souhaitent pas, en première intention, d'amniocentèse.

Ce test est proposé depuis janvier 1997, sa diffusion dans la population générale s'est réalisée très rapidement avec un taux de couverture proche de 80 % dès 1998 [41].

L'inconvénient du dépistage par les MSM du 2^{ème} trimestre est qu'il débouche sur un diagnostic relativement tardif, les résultats de l'amniocentèse étant au mieux disponibles vers 16–17 SA et souvent plus tard, à un terme où l'IMG est une épreuve particulièrement pénible pour les femmes.

De plus, l'utilisation isolée des MSM pour le dépistage de la T21 aboutit à un taux élevé d'amniocentèses.

C'est pourquoi des stratégies de dépistage précoce ont été développées au 1^{er} trimestre de la grossesse, reposant sur la mesure échographique de la clarté nucale (CN). Ces stratégies pourraient, d'une part, déboucher sur un DPN par biopsie de trophoblaste qui permettrait un diagnostic précoce à un terme où l'interruption de grossesse peut se faire par une technique d'aspiration, mieux tolérée et, d'autre part, diminuer le nombre d'amniocentèses induites.

Clarté nucale

3-1 Définition

La CN, mesurée à l'échographie entre la 10^{ème} et la 13^{ème} SA, désigne la région anéchogène située dans la partie postérieure du cou du fœtus. L'hyperclarté nucale, cloisonnée ou non, constitue actuellement le signe échographique le plus performant pour quantifier le risque de Down syndrome. Ce signe a été découvert par Bronshtein en 1989 [52] puis a été décrit par Szabo en 1990 [53]. L'augmentation de la CN n'a pas encore d'explications physiopathologiques très claires. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer cette hyperclarté chez les fœtus anormaux est qu'il s'agit pour l'essentiel d'un retard dans la connexion des vaisseaux lymphatiques avec le système veineux, ce qui explique que le signe peut disparaître au cours du 2^{ème} trimestre. Cependant, comme l'a montré Borrel [54],

l'évolution inverse est également possible, avec l'apparition d'un épaissement secondaire au cours de l'évolution entre 10 et 23 SA.

3-2 Mesure

Pendant très longtemps, le seuil utilisé pour la définition d'une hyperclarté nucale a été de 2,5 mm ou 3 mm alors qu'il est bien démontré actuellement que l'épaisseur de la nuque augmente avec l'âge gestationnel. Il est donc indispensable de tenir compte de l'âge gestationnel lorsque l'on veut déterminer le risque lié à l'épaisseur de la nuque. Dans l'étude de Snidjers portant sur 100 000 grossesses, la médiane passe de 1,2mm à 11 SA à 1,9mm à 13 + 6 SA [55].

a- Les critères de mesure échographique (figure 2)

La majorité des échographistes utilisent les règles établies par Nicolaides et ses collaborateurs [56] :

- La mesure est réalisée entre 10 et 14 SA
- Le plan de mesure doit être strictement longitudinal passant par tout le rachis
- Le fœtus doit être observé à fort grossissement, occupant les 2/3 de l'écran
- Il faut bien différencier la peau du cou de l'amnios et donc parfois attendre ou provoquer les mouvements actifs fœtaux. Le piège étant de confondre la membrane amniotique, qui sépare la cavité amniotique du coelome extra-embryonnaire, avec la peau nucale.
- Le placement des calipers, principale source de différences inter-opérateurs, doit se faire d'une part, en profondeur, sur la partie externe des tissus mous de la nuque de la nuque, et d'autre part, en surface, à la partie interne des tissus cutanés.



Figure 2 : mesure de la CN

b- Problèmes techniques de la mesure :

Chez un fœtus normal, la CN est habituellement comprise en fin de 1^{er} trimestre entre 1 et 2,5 mm. Or la résolution axiale des ultrasons émis par une sonde abdominale de 3 MHz est de l'ordre de 1 mm. C'est pourquoi il est recommandé d'utiliser des fréquences plus élevées comme 5 MHz qui ont un moindre pouvoir de pénétration mais une meilleure résolution axiale [57]. En cas d'impossibilité technique, il faut recourir à la voie endovaginale.

Pour éviter une erreur de datation, il est proposé de rapporter la mesure de la CN à la longueur crânio caudale (LCC) du fœtus, d'utiliser le seuil du 95^{ème} percentile puis grâce à un logiciel d'évaluer le risque en fonction de l'âge maternel.

Le logiciel distribué en France par le Fetal Medicine Foundation sous l'égide de Nicolaïdes repose sur un principe simple [58] : le risque d'anomalies chromosomiques lié à

l'âge maternel est multiplié par un facteur de correction d'autant plus élevé que la CN est grande .

3-3 Distinction sémiologique

La CN est une image rétro-cervicale anéchogène située entre les tissus mous rétro rachidiens en avant et la peau en arrière. Elle est souvent de dimension plus modeste que dans les hygromas, mais plus la CN est épaisse, plus le risque que le fœtus soit porteur d'une anomalie chromosomique est important.

Le principal diagnostic différentiel de la CN est représenté par l'hygroma kystique. Il s'agit d'une tuméfaction liquidienne, rétro et/ou latéro-cervicale cloisonnée. Elle est en général plus épaisse que la CN. Comme les CN, il est capable de régression, mais de façon beaucoup plus lente. Le taux d'anomalies chromosomiques et le risque de pathologie grave y sont en général plus importants que dans les CN.

Le recours aux techniques tridimensionnelles permettrait de différencier la CN de l'hygroma kystique.

Les autres diagnostics différentiels de la CN sont l'encéphalocèle occipitale, le non accollement de l'amnios, le cordon autour de la nuque et une hyperextension ou une flexion de la tête [59].

3-5 Les résultats

De nombreuses études ont été réalisées chez des patientes à haut risque avant les prélèvements ovulaires. Dans cette population où la prévalence atteint ou dépasse 1%, la sensibilité moyenne est de 52% à 77% avec 3,2% à 6,9% de faux positifs (tableau 3) [60].

Tableau 3 : Les performances de la CN dans le diagnostic des aberrations chromosomiques chez les patients à haut risque

Auteur	Période	Limite choisie	Sensibilité totale	T 21	Faux +
Szabo et al, 1995	9 – 12	> 3 mm	92%	88%	2,7%
Comas et al, 1995	9 –13	>4 mm	50%	57%	0,7%
Brambatti et al, 1995	8–15	>3 mm	30%	27%	3,2%
Kornman et al, 1996	(13	>3 mm	0%	0%	5%
Szabo et al, 1997	9 –12	>2,5mm	86%		1,6%
Borrell et al, 1997	10 –18	>3mm	52%	53%	1,4%
Martinez et al, 1997	10 –13	>2,5mm	58%	55%	3,4%
Pandya et al, 1995	10 –14	>3mm	77%	77%	6,9%
Zimmermann et al, 1996	10 – 13	>3mm	50%	50%	2%
D'Ottavio et al, 1997	13 –15	>4mm	62%	70%	0,6%
Orlandi et al, 1997	9 –13	>1,0mm	57%	40%	5,8%

La CN est ≥ 3 mm chez 90% des fœtus ayant une T13 ou T18, 80% des T21 et 5% des fœtus normaux. Pour ce même taux de faux positifs, la sensibilité de cette méthode de dépistage est nettement plus favorable que l'utilisation de l'âge maternel seul (sensibilité de 20–30% pour dépister les T21) ou associées à la biochimie maternelle (sensibilité 50–60%) [61]. Il est important de préciser que si le signe régresse le plus souvent après 14 SA, ceci ne permet pas de préjuger de la normalité du caryotype.

Le dépistage échographique de la T21 par mesure de la CN peut ainsi atteindre un niveau de performance supérieur à celui des MSM, à condition que les mesures soient faites de façon rigoureuse et soumises à un contrôle de qualité stricte.

3-6 Synthèse

La mesure de la CN s'inscrit dans l'échographie morphologique du 1^{er} trimestre dont elle n'est qu'un des éléments. Son excellente sensibilité et sa spécificité pour le

dépistage des anomalies chromosomiques (mais aussi cardiaques) en font un critère fondamental du suivi de grossesse.

En revanche, les résultats obtenus d'une équipe à l'autre ne sont pas standardisés. Mais les très bonnes performances obtenues en Grande-Bretagne par l'équipe de Nicolaides [62] laissent penser que la mise en place de la mesure de la CN doit s'inscrire dans un contexte de formation médicale spécifique et de contrôle de qualité obligatoire.

Dans les pays anglo-saxons, deux conceptions s'affrontent :

-Aux Etats-Unis, la priorité est accordée aux marqueurs biologiques, à cause de la standardisation des techniques de mesure, et le risque d'aneuploïdie est éventuellement réévalué lors de l'échographie du 2^{ème} trimestre [63].

-En Grande-Bretagne, le dépistage de base est réservé à la mesure de la CN au 1^{er} trimestre dans le cadre d'un réseau volontaire adoptant les principes de la fetal Medicine Foundation , établis par Nicolaides, éventuellement associées au marqueurs biologiques au 2^{ème} ou plutôt au 1^{er} trimestre [64].

3-7 Dépistage séquentiel

L'évolution de ces différents tests de dépistage a amené à les utiliser de façon séquentielle [65]. Chaque femme a un risque individuel que son fœtus ait une anomalie chromosomique. Afin de pouvoir calculer ce risque individuel, il est nécessaire de tenir compte du risque de base de la patiente qui, lui-même, dépend de son âge, du terme et de ses antécédents d'enfants avec anomalies chromosomiques. Ce risque sera multiplié par un certain facteur qui sera calculé sur la série de tests de dépistage obtenus lors de la grossesse. Chaque fois qu'un test de dépistage est effectué, le risque de base est multiplié par un facteur et l'on obtient un nouveau risque calculé; en toute logique, si on utilise ultérieurement un autre test indépendant de celui-là, c'est ce risque calculé qu'il faudra prendre comme risque de base en accord avec la théorie baylésienne des tests statistiques indépendants. Ce dépistage est appelé dépistage séquentiel. Seul un dépistage séquentiel permet de réduire le nombre de faux positifs et donc d'amniocentèses.

Par contre cette méthode présente un défaut structurel puisqu'il n'est pas logique d'attendre que tous les tests soient effectués pour informer la patiente, et qu'un certain nombre de

patientes seront prélevées lors de tests intermédiaires quand celui-ci fait apparaître un risque très élevé.

4- Antécédent d'enfant porteur d'anomalie chromosomique non héritée

Il s'agit d'un couple, à caryotype normal, qui a eu un enfant porteur d'anomalies chromosomiques, de nombre ou de structure : On parle alors d'anomalie chromosomique survenue de novo, résultant d'une erreur de division cellulaire, ou d'une disjonction. Cet accident chromosomique entraîne un risque de récurrence de plus de 1% lors d'une grossesse subséquente et ce risque peut être beaucoup plus élevé qu'attendu chez une femme âgée de 30 ans ou moins. A 20 ans, le risque de T21 est d'environ 1/2000, de 1/1200 à 25 ans, 1/900 à 30 ans, 1/300 à 35 ans, 1/100 à 40 ans et 1/40 à 45 ans [66]. Ce risque signifie également que l'aneuploïdie peut toucher d'autres chromosomes que le chromosome surnuméraire. Par exemple, une femme qui aurait conçu un fœtus présentant une T21 pourrait, lors d'une grossesse subséquente, concevoir un enfant qui aurait une trisomie 13 ou 18, ou encore une aneuploïdie impliquant un chromosome X soit un syndrome XXX ou XXY. Il est également possible qu'une trisomie impliquant un autre autosome soit non viable. En pratique, si la femme a eu un antécédent d'enfant porteur d'anomalies chromosomiques non héritées, l'amniocentèse est proposée même si le risque est faible, avant tout pour rassurer le couple.

Cependant, il existe des mosaïques germinales c'est-à-dire que l'un des parents produit à la fois des gamètes avec formule chromosomique normale et des gamètes déséquilibrés. On doit y penser et rechercher une anomalie germinale parentale lorsque l'on rencontre un couple qui a eu 2 voire plusieurs enfants atteints de la même anomalie chromosomique.

5- Parent porteur d'un remaniement chromosomique

L'existence d'une anomalie de structure au caryotype d'un des parents, constitue une indication impérative en raison de l'importance du risque d'anomalie fœtale.

Il peut s'agir d'une translocation réciproque équilibrée, d'une translocation observationnelle ou d'une inversion péri ou paracentrique. Pour les translocations réciproques équilibrées et pour les inversions, le risque sera fonction des points de remaniements : des cassures proches des télomères, surtout pour les autosomes, seront plus susceptibles de générer des conceptus viables mais malformés, alors que des remaniements impliquant des fragments de grande taille seront responsables de fausses couches précoces.

Il est possible de définir un risque de gamètes déséquilibrés en fonction des points de cassure et des chromosomes impliqués : un logiciel a été mis au point au CHU de Grenoble.

–Pour les translocations robertsoniennes surtout la 14;21 le risque qu'il y'ait une T21 par translocation est de 15% si c'est la mère qui est porteuse du remaniement et de 5% si c'est le père [67].

–en cas de translocation réciproque, le risque foetal théorique est de 50% [68]. En pratique on observe 10% de caryotypes déséquilibrés qui amènent à interrompre la grossesse.

–en cas d'inversion péricentrique on observe environ 5% de caryotypes fœtaux.

Les signes d'appel échographiques

Comme nous l'avons vu, l'avancée la plus importante en échographie a concerné la description de l'hyperclarté nucale du fœtus trisomique visible dès le 1^{er} trimestre mais les anomalies chromosomiques peuvent avoir d'autres expressions phénotypiques précoces accessibles à l'échographie morphologique du 2^e ou 3^e trimestre.

L'expression phénotypique d'une anomalie chromosomique peut se faire soit sous forme d'un syndrome poly malformatif qui peut être tout à fait évocateur d'une aneuploïdie spécifique c'est le cas particulièrement d'une trisomie 13, trisomie 18, triploïdie ou de certaines anomalies de structure. Les signes échographiques sont parfois caricaturaux, parfois plus discrets (association d'un hydramnios ou d'un retard de croissance à une anomalie des extrémités par exemple). Parfois encore une seule malformation est décelée à l'échographie.

C'est pourquoi les travaux des années 80 à 90 se sont attachés à décrire de nombreux signes mineurs tels qu'un fémur court, des anomalies mineures des extrémités ou un profil inhabituel.

La question s'est alors posée de savoir quels signes échographiques étaient suffisamment évocateurs pour justifier de prendre le risque d'un prélèvement invasif.

Le problème clinique, autrefois posé par la découverte d'un signe d'appel mineur isolé au 2ème ou au 3ème trimestre est aujourd'hui considérablement simplifié par le calcul du risque individuel intégrant l'ensemble des paramètres disponibles (âge, MSM, clarté nucale, signes échographiques tardifs).

6-1 Les signes majeurs

Un grand nombre de malformations fœtales affectant des organes très divers peuvent être l'expression phénotypique d'une aberration chromosomique [69]. Les caryotypes réalisés dans un contexte malformatif sont anormaux dans 14 à 16,8 % des séries [70].

Il s'agit :

–des malformations cardiaques :

Les anomalies du cœur et des gros vaisseaux représentent les pathologies congénitales les plus fréquentes, avec une prévalence de 0,5 à 1 % des naissances [71]. Un certain nombre de pathologies cardiaques majeures peuvent être diagnostiquées dès l'échographie du 1er trimestre par des opérateurs entraînés [72].

Jusqu'à 40% des fœtus ayant une malformation cardiaque ont des anomalies chromosomiques. Le pourcentage d'association à une anomalie chromosomique dépend du type de cardiopathie. Dans l'étude de baltimore, Ferencz trouvait 18% d'anomalies chromosomiques associées aux cardiopathies conotrocales, 60% dans les canaux atrio ventriculaire, 1% dans les anomalies obstructives du cœur droit et 6,6% dans les anomalies du cœur gauche. Une étude plus récente a permis de trouver, à partir du diagnostic de cardiopathie, 18,5% d'anomalies chromosomiques [73].

Lorsqu'on teste statistiquement les associations entre anomalies chromosomiques et cardiopathies, l'association très forte entre communication atrio ventriculaire et T21 masque

les autres. Si on exclut cette dernière, on observe qu'environ 2 % des hypoventricules gauches et 5 % des ventricules droits double issue entrent dans le cadre d'une T18, tandis que moins de 1 % des transposition des gros vaisseaux, et environ 3 % des tétralologies de Fallot entrent dans le cadre d'une T13. Comme il est classiquement décrit, 2 % des communications auriculaires sont associés à une monosomie X (syndrome de Turner) [73].

Le dépistage des cardiopathies congénitales par l'échographie constitue donc un point d'appel majeur pour le DPN des anomalies chromosomiques et impose la pratique systématique d'un caryotype (sauf pour la transposition des gros vaisseaux) .

–des malformations digestives [73] : découvertes inopinément au cours la grossesse, les malformations digestives posent le problème de leur étiologie et du pronostic vital. La fréquence des anomalies chromosomiques reste élevé : 27,4 % pour les sténoses duodénales isolées et 33,3 % pour l'ensemble des anomalies digestives, lorsque celle-ci sont associées à une autre malformation. L'atrésie duodénale est bien connue pour être fréquente dans la T21. Quelque soit l'aspect échographique, les dilatations digestives imposent le caryotype fœtal.

–des malformations urinaires [73] : Elles sont fréquentes et le pratique du caryotype dépend de l'association malformative ou de l'anomalie : quand l'uropathie est associée à un autre symptôme échographique, même mineur, le risque d'aneuploïdie justifie toujours le caryotype fœtal. Si l'uropathie apparaît strictement isolée, la question du caryotype doit être abordée de façon nuancée. Ainsi, la découverte d'une pyélectasie isolée multiplie le risque d'aneuploïdie par un facteur compris entre 1,2 et 6. 17 à 25 % des fœtus trisomiques ont une pyélectasie pour 2 à 3 % de la population normale. La constatation d'une pyélectasie isolée ne semble pas entraîner une hausse notable du risque d'aneuploïdie foetale, chez les femmes ne présentant que de faibles risques, et ne justifie pas le recours au DPN invasif [74].

Ce calcul de risque devra donc s'intégrer aux autres marqueurs (âge maternel, CN, marqueurs), avant de juger de l'opportunité d'un caryotype.

–des malformations de la paroi abdominale [73] :

2 types de defect sont maintenant parfaitement identifiables au cours de l'échographie anténatale : laparoschisis et omphalocèle.

- L'omphalocèle est due à l'absence de fermeture de la paroi ventrale de l'embryon avant la 9^{ème} semaine de gestation. Il s'agit d'une embryopathie ou les malformations associées, fréquentes, en particulier les anomalies chromosomiques, cranio-faciales ou cardiaques, atteignent presque un malade sur 2. Le DPN impose la pratique d'un caryotype pour les rechercher.
- Le laparoschisis est bien différent puisqu'il s'agit d'un défaut de fermeture de la croissance pariétale, probablement d'origine vasculaire. Il y'a très peu d'anomalies associées dans le laparoschisis. Un caryotype n'est donc pas recommandé. Par contre, une hypotrophie fœtale modérée est très fréquemment observée, c'est pourquoi une surveillance rapprochée par échographie est indispensable pour guetter des signes imposant l'extraction.

–des malformations du système nerveux central (SNC) :

Les DFN sont relativement peu fréquents en France ou leur incidence moyenne est de 1 / 1000 avec des variations régionales allant de 0,2 à 2 pour 1000. La répartition est :

- près de 50 % d'anencéphalies et exencéphalies
- près de 50 % de spina bifida (dont 90% de myéloménigocèles et 10% de méningocèles)
- 3 % d'encéphalocèle

La fréquence des anomalies chromosomiques est de

- 10 à 13 % parmi les spina bifida : il s'agit essentiellement des trisomies 18 et 13, et des triploïdies.
- 0,5 % parmi les anencéphalies

En pratique, devant un taux sérique d' α FP $\geq 2,5$ MoM, une exploration échographique dans un centre de référence ciblée sur le pôle céphalique et le rachis est réalisée : si elle est normale, le prélèvement systématique de LA pour évaluer la concentration d' α FP et d'acétylcholinestérase est controversé.

Il est recommandé de pratiquer dans ce cas une échographie à 22 SA, toujours en centre de référence, qui confirmera l'absence ou la présence d'anomalies.

Si l'échographie retrouve des malformations du tube neural, à n'importe quel terme de la grossesse, un caryotype fœtal est réalisé à la recherche d'anomalies chromosomiques.

S'il persiste un doute sérieux quant à la possibilité d'une anomalie fœtale du tube neural, on doit effectuer une amniocentèse avec dosage de l' α FP et de l'acétylcholinestérase qui seront augmentés en cas d'ouverture du tube neural. Ces dosages permettent un diagnostic correct dans 99% des cas, avec un taux de faux positifs de 0,34 % [75].

– la Hernie de coupole diaphragmatique :

Les hernies de coupole diaphragmatique sont des malformations de mauvais pronostic caractérisées par une absence partielle ou totale de développement d'un coupole. Une anomalie du caryotype est retrouvée dans 45% des cas de hernie diaphragmatique. Il s'agit pour l'essentiel de la trisomie 13, 18 et la tétrasomie 12p. Un prélèvement fœtal pour caryotype est, de ce fait, indispensable. Leur pronostic, toutefois, est lié en très grande partie à l'existence d'une hypoplasie pulmonaire d'autant plus importante que la hernie s'est développée tôt pendant la grossesse et responsable d'un taux de mortalité post-natale qui atteint 50 à 60% [76].

– La ventriculomégalie :

La ventriculomégalie cérébrale est définie par des mesures auriculaires > 10 mm. Lorsque la ventriculomégalie est isolée, l'incidence d'un caryotype fœtal anormal est estimée à 3,8 %. La ventriculomégalie latérale idiopathique est constatée chez environ 0,15 % des foetus normaux sur le plan chromosomique, tandis que 1,4 % des foetus présentant une trisomie 21 présente également, au 2^{ème} trimestre, une ventriculomégalie idiopathique [77]. À la suite d'un DPN de ventricomégalie, une évaluation maternelle visant les infections congénitales est recommandée. L'amniocentèse devrait être offerte aux fins du caryotypage et à la recherche d'infections congénitales [78]. D'autres modalités d'imagerie, comme l'imagerie par résonance magnétique pourraient être envisagées [79].

6-2 Les signes mineurs

–Hydramnios

L'hydramnios isolé est associé à 1,7 à 3,2 % d'aberrations chromosomiques mais ce signe prend davantage de valeur lorsque existant en concomitance soit un retard de croissance intra-utérin (RCIU) soit des malformations fœtales.

La réalisation systématique d'un caryotype en cas d'hydramnios est une pratique discutée selon les auteurs.

Lorsque existent des signes échographiques associés à l'hydramnios, une anomalie du caryotype est retrouvée dans 6,5 à 27,6 % des cas et justifie donc la pratique d'un prélèvement fœtal à cet effet. En fonction du terme et du degré d'urgence de l'obtention, il faut choisir entre l'amniocentèse ou le PSF.

Lorsqu'il s'agit, à l'inverse, d'un hydramnios idiopathique, la fréquence des anomalies du caryotype est beaucoup plus réduite, de 1,7 à 9 %, voire identique à celle de la population générale. Aucune étude ne peut actuellement répondre à la question de l'opportunité de réaliser un caryotype devant un hydramnios isolé.

– L'oligoamnios :

L'oligoamnios exprime une pathologie chromosomique dans environ 4% des cas. Un oligoamnios retrouvé à l'échographie du 2^{ème} trimestre nécessite, après avoir éliminé une rupture prématurée des membranes, de rechercher une malformation associée, le plus souvent urinaire, par échographie. Une amniocentèse permettra ensuite de faire le caryotype puisque dans 5% des cas, une anomalie chromosomique y est retrouvée, surtout s'il y'a un RCIU associé. Enfin, il faut s'acharner à rechercher l'hypoplasie pulmonaire fœtale qui est la conséquence la plus redoutable.

–le RCIU :

La survenue plus ou moins précoce d'un RCIU est un élément d'orientation important : Une mesure de la LCC inférieure de plus d'une semaine aux valeurs normales est évocatrice de la T13 et 18. Cette inhibition de la croissance ne s'observe pas dans la T21 ni dans les anomalies des chromosomes sexuels. Les résultats sont discordants concernant les triploïdies. Quoi qu'il en soit, le risque d'aneuploïdie est multiplié par 9 lorsque le raccourcissement observé de la LCC est >14mm [80] notent également une diminution significative des mensurations céphaliques et du cervelet en cas de T13. Il est donc

recommandé, après avoir éliminé une erreur de terme et un diabète, d'effectuer un caryotype en cas de RCIU précoce [81].

Dans les cas où le RCIU est sévère et que le caryotype est normal, un prélèvement est souhaitable à la recherche de syndromes microdélétionnels [82,83].

–Nuque épaisse

Ce signe est décrit depuis 1985 par Benacerraf [73]. Il s'agit d'un épaissement des tissus de la région nucale mesuré entre la 15 et 20ème SA. Le seuil proposé est de 6 mm et plus. Dans la première étude portant sur la nuque épaisse [73], 40 % des foetus trisomiques sont identifiés pour seulement 0,1 % de foetus normaux. D'autres auteurs retrouvent une sensibilité variant entre 40 – 75 % pour un taux de faux positif < 2 %. Ce signe avait une VPP de 69 %. Sur une série multicentrique de 371 nuques épaisses, 33 % étaient associées à une aneuploïdie, soit, 85 T21, 10 syndromes de Turner, 9 T18 et 19 autres anomalies [84]. Une autre étude, portant sur la combinaison de 7 larges séries, montre que l'épaississement nuchal ≥ 6 mm dépiste 35 % de trisomies pour 0,73 % de foetus normaux [85], ainsi le facteur de vraisemblance est de 48 pour ce marqueur. Cette nuque épaisse peut également être retrouvée dans d'autres pathologies telle que les cardiopathies ou le syndrome de Noonan.

–Fémur et Humérus courts.

50% des foetus trisomiques ont manifestement des membres courts. Snijders et Nicolaïdes ont montré dans une série de 8 études une sensibilité de 28 % pour un taux de faux positifs de 4,3 %, soit un risque relatif multiplié de 6,5 en cas de fémur court. Toutefois, la majorité de ces études ne mentionnent pas le caractère isolé ou associé du fémur court. Le risque relatif en cas de fémur court isolé est de 2,3; alors qu'il est de 2,5 pour l'humérus court [73]. Beaucoup d'autres auteurs n'ont pas retrouvé une sensibilité suffisante de l'un ou l'autre de ces signes pour une utilisation en dépistage. D'autre part, Benacerraf démontre que les populations noires ont des fémurs significativement plus longs, que les patientes asiatiques ont des fémurs plus courts par comparaison à la population blanche.

–Intestin hyperéchogène.

L'intestin grêle est considéré hyperéchogène, lorsqu'il présente la même échogénicité que l'os. Il peut être associé à la T21, à la mucoviscidose, au RCIU précoce et sévère, aux infections (cytomégalovirus) et à un taux élevé de mort in utéro.

La présence d'un intestin échogène est associée à un risque accru d'aneuploïdie fœtale : T13, 18 et 21, et les chromosomes sexuels. Elle a été retrouvée chez 0,6 à 2,4 % des fœtus à l'échographie du 2^{ème} trimestre et chez 9 % des fœtus présentant une aneuploïdie [85]. Un caryotype fœtal est souhaitable en cas d'intestin hyperéchogène, même isolé [73].

– Les hyperéchogénités intracardiaques.

Les critères diagnostiques sont la présence de foyers hyperéchogènes au sein de la lumière ventriculaire, surtout gauche, de même intensité que celle de l'os. Des calcifications ont été retrouvées sur les piliers de la mitrale chez 39 % des T13, 16 % des T21 et 2 % de fœtus normaux à l'examen anatomopathologique [73]. Elles sont difficiles à interpréter, du fait de leur aspect plus ou moins échogène. Wax et ses collaborateurs considèrent qu'il ne faut prendre en compte que celles qui ont une échogénicité égale ou supérieure à celle de la colonne vertébrale. Leur signification pathologique est incertaine, notamment lorsqu'elles sont isolées et apparaissent chez des gestantes à faible risque. Elles devraient cependant être prises en considération dans la population à haut risque (âge > 35ans ou risque > 1/250).

Place des signes mineurs dans le dépistage de la T21

Si l'on considérait comme suffisant pour indiquer une amniocentèse un seul de ces différents signes mineurs, on aboutirait à un taux inacceptable de prélèvements ovulaires, avec un risque beaucoup plus important de provoquer des fausses couches de fœtus normaux, induites par l'amniocentèse que de réaliser des IMG pour trisomies. Vintzielos [86] et Bromley [87] ont montré qu'avec un seul signe on dépiste certes 62,5% à 92,8% des T21, mais au prix de 13,3 à 17,5% d'amniocentèses. Pour Viora [88] un signe mineur est présent dans au moins 70% des cas, mais avec 28% de faux positifs entre 15 et 19 SA. Il apparaît donc comme impératif de regrouper les signes dans la population à bas risque [89]. Avec trois signes comme la nuque épaisse, la pyélectasie bilatérale et l'humérus court, Vintzielos [86] détecte 87% des T21 en réduisant à 6,7% le taux de faux positifs. La plupart des auteurs considèrent que le signe mineur principal reste l'épaisseur de la nuque que l'on peut

associer aux mensurations du fémur et de l'humérus ou à la recherche d'anomalie d'organe comme le cœur.

6-3 Sonographie génétique

Il est évident que l'association de plusieurs marqueurs permet d'optimiser la sensibilité du dépistage.

Benacerraf [90] et Bromley [91] ont proposé un score où l'amniocentèse n'est indiquée qu'à partir de 2 points: incluant les marqueurs majeurs (nuque épaisse, cardiopathie ...) score de 2, car à eux seuls la réalisation d'un caryotype s'impose, les marqueurs mineurs, score 1 (fémur court, pyélectasie, ...). Elles démontrent que si un score ≥ 2 est utilisé pour décider d'une amniocentèse, alors la sensibilité du dépistage de la T21 est de 73 % pour un taux de prélèvement de 4 %. Ce même score peut être utilisé en cas d'échographie normale (score 0). Ce score permet de diminuer le risque des patientes inférieure à 35 ans de 5 /1000 à 1,5/1000. L'absence des petits marqueurs permet de diminuer le risque individuel d'une patiente de 40% [81] à 50% [82]. Vintzileos utilise également cette approche permettant une sensibilité de 87 % de dépistage des trisomies 21 [92].

Le risque principal d'une telle stratégie est évidemment l'impact médico-légal, car le quart ou le cinquième des aberrations chromosomiques ne sera pas dépisté, alors qu'il existait un signe mineur, d'où une possible plainte fondée sur un défaut de moyens diagnostiques.

LES MALADIES GENIQUES

Introduction

Tous les modes de transmission peuvent être impliqués :

- les maladies autosomiques dominantes avec un risque de 50% pour la descendance d'un sujet atteint. Ex : la myotonie de Steinert
- les maladies récessives autosomiques, avec un risque de 25% pour la descendance d'un couple dont les conjoints sont hétérozygotes pour un même gène. Ex : la mucoviscidose
- les maladies récessives liées à l'X avec un risque sur 2 qu'un garçon soit atteint si la mère est vectrice d'un gène responsable. Ex : la myopathie de Duchenne.

Là 3 circonstances nous amènent à faire le diagnostic d'une maladie génique :

- soit le couple est à risque en raison d'antécédents familiaux
- soit devant la découverte d'une anomalie échographique
- soit en population générale, pour les maladies les plus fréquentes

Dépistage des maladies génétiques dans les familles à risque

L'existence d'une maladie génétique chez un apparenté plus ou moins proche peut conduire un couple à s'interroger sur le risque encouru par ses propres enfants. Ce risque dépend du lien de parenté avec le sujet malade et du mode de transmission de l'affection en cause; le couple peut s'adresser au généticien pour faire préciser au mieux le risque qu'il encoure personnellement et les moyens d'y faire face par le DPN.

Cependant, tous les couples n'ont pas la même interrogation et certains peuvent ne découvrir leur situation à risque qu'après avoir donné naissance à un enfant malade, naissance qu'ils auraient pu éviter s'ils avaient eu connaissance de ce risque auparavant.

Mais pour quelle maladie, à partir de quel risque, doit on informer les apparentés d'un sujet atteint du risque potentiel d'avoir un enfant atteint et les moyens d'y faire face ?

La réponse n'est pas simple à donner d'autant plus que le message est différent selon la pathologie en cause et son mode de transmission.

2-1 Maladies liées au sexe

Pour les maladies liées au chromosome X comme pour les remaniements de structure chromosomique, le risque a priori d'être porteur sain est souvent relativement élevé; tout dépend en fait du statut réel de la personne apparentée au malade ou au sujet transmetteur. L'information doit être diffusée de génération en génération, des apparentés les plus proches aux apparentés les plus éloignés. Si un test génétique est disponible il permet de définir au mieux le statut de la personne à risque dans de bonnes conditions.

Les retards mentaux liés à l'X sont fréquents et représentent 25 à 50 % de tous les retards mentaux héréditaires, dont la prévalence est estimée de 1 à 2 %. C'est un ensemble de pathologies cliniquement hétérogènes, liées à des mutations de gènes différents.

Ces pathologies atteignent préférentiellement les garçons et sont transmises par des femmes conductrices.

2-2 Maladies autosomiques récessives

La situation est tout autre pour les maladies récessives autosomiques. En dehors d'une union consanguine, le risque a priori encouru par la descendance d'un apparenté est faible, habituellement inférieur à 1/100. Dépister une hétérozygotie chez un sujet n'a pas de conséquence pour lui. En revanche connaître les couples à risque de 1/4 de donner naissance à un enfant atteint est d'un grand intérêt s'il s'agit d'une maladie grave accessible au DPN.

Rappelons que ce risque est calculé en tenant compte de la probabilité pour l'apparenté d'être hétérozygote (2/3 pour le germain, 1/2 pour l'oncle ou la tante, 1/3 pour le neveu ou la nièce, 1/4 le cousin germain) et de la fréquence des hétérozygotes dans la population générale (1/25 pour la mucoviscidose, 1/60 pour l'hyperplasie des surrénales, risque plus ou moins élevé pour les hémoglobinopathies selon l'origine ethnique).

Ainsi peut on évaluer le risque a priori pour un couple d'avoir un enfant atteint (tableau 4)

Tableau 4 : Maladies autosomiques récessives : risque à priori selon le lien de parenté

Lien de parenté avec sujet atteint	Probabilité d'être hétérozygote	Risque a priori encouru par les enfants	
		Mucoviscidose	hyperplasie surrénale
Frère /sœur	$2/3$	$2/3 \times 1/25 \times 1/4 = 1/150$	$2/3 \times 1/60 \times 1/4 = 1/360$
Oncle/tante	$1/2$	$1/2 \times 1/25 \times 1/4 = 1/200$	$1/2 \times 1/60 \times 1/4 = 1/480$
Neveu/nièce	$1/3$	$1/3 \times 1/25 \times 1/4 = 1/300$	$1/3 \times 1/60 \times 1/4 = 1/720$
Cousin germain	$1/4$	$1/4 \times 1/25 \times 1/4 = 1/400$	$1/4 \times 1/60 \times 1/4 = 1/960$

2-3 Maladies autosomiques dominantes

Les anomalies des protéines de structure [93] se transmettent selon ce mode, en particulier un grand nombre d'anomalies squelettiques comme l'achondroplasie, la maladie exostosante.

Le risque théorique de récurrence est de 50 % quand l'un des parents est atteint ; on peut cependant se demander s'il est opportun d'informer des personnes qui ne se posent pas de questions au sujet d'une affection dont le DPN soulève habituellement des questions éthiques notamment quand il s'agit de maladie à début plus ou moins tardif et à expression variable.

Dépistage des maladies génétiques sur signes échographiques

Il s'agit d'une situation relativement récente où la découverte d'une anomalie lors d'une échographie systématique oriente vers une maladie génétique dont le futur enfant sera le premier cas identifié dans la famille. La première étape consiste à confirmer la réalité du signe échographique, et à s'assurer de l'absence d'une cause plus fréquente de l'anomalie identifiée.

Puis en fonction des signes échographiques :

–si anomalie échographique suggestive de pathologie génétique grave tel que immobilisme fœtal, cardiopathie létale ou syndrome poly malformatif, anomalie rénale avec insuffisance rénale terminale in utero; dans ce cas, le diagnostic est et restera échographique. Le recours à la biologie moléculaire n'est pas souhaitable du fait de la

grande variabilité d'expression des maladies génétiques, de l'hétérogénéité allélique et génétique.

–si anomalie mineure : situation plus difficile puisqu'il est rare qu'une certitude diagnostique soit obtenue, et encore plus rare que le pronostic soit univoque. Ceci rend la prédiction du devenir post natal difficile.

❖ Découverte prénatale d'une cardiopathie congénitale

Environ 5% des malformations cardiaques sont en rapport avec une anomalie génique.

La découverte d'une cardiopathie conotruncale (par exemple tétralogie de Fallot) à l'échographie impose la recherche par cytogénétique moléculaire de la délétion du chromosome 22q11 responsable du syndrome de Di George.

❖ Découverte d'une masse intestinale hyperéchogène

Une hyper échogénicité intestinale, plus ou moins associée à des images de dilatation intestinale évocatrices d'une obstruction digestive et /ou à une absence de vésicule biliaire sont des anomalies très évocatrices de mucoviscidose. La fréquence dans ces cas en est de 3% et impose une étude moléculaire à la recherche de mutations au locus CFTR ainsi que la recherche d'une infection virale (CMV surtout).

Si le terme de la grossesse est inférieur à 20 SA, le dosage des enzymes intestinales dans le LA est contributif : un dosage normal avant ce terme permet d'exclure une mucoviscidose.

Mais seule l'identification chez le fœtus de deux mutations, héritée chacune d'un parent, pose le diagnostic certain de mucoviscidose [94].

❖ Découverte échographique d'un omphalocèle

Le principal problème est d'éliminer une anomalie chromosomique par le caryotype fœtal ou une malformation associée par l'échographie. Dans certains cas (macrosplanchnie), la question du diagnostic moléculaire du syndrome de Wiedmann–Beckwith a été soulevée. Il serait alors possible de faire le diagnostic par les méthodes de la génétique moléculaire.

❖ Découverte prénatale d'une anasarque inexpliquée

La découverte échographique d'une anasarque (œdème sous cutané fœtal généralisé avec épanchement des séreuses) peut déboucher sur un diagnostic de maladie génique.

Une cause curable doit être reconnue en urgence (anémie fœtale acquise, compression médiastinale réversible, trouble du rythme cardiaque accessible au traitement médical) ;

Dépistage des maladies génétiques en population générale

Bien que de nombreuses maladies génétiques soient techniquement dépistables en population générale, il n'y a à ce jour aucun programme de dépistage commun à tous les pays européens en dehors du dépistage néonatal historique. La plupart des dépistages sont effectués dans le cadre d'enquêtes pilotes ou limités à des populations à haut risque.

Les pathologies concernées sont :

❖ Hémoglobinopathies

Ce sont les β -thalassémies homozygotes qui prédominent largement le groupe de ces maladies génétiques; elles sont particulièrement fréquentes chez les personnes d'origine asiatique, mais restent très présentes chez les Méditerranéens et les personnes originaires du Moyen-Orient. En raison du caractère habituellement autosomique récessif, les parents et singulièrement la femme enceinte n'ont pas de signe d'appel particulier, le diagnostic est souvent rétrospectif, suite à la démarche diagnostique effectuée sur un enfant né affecté.

❖ Mucoviscidose

La mucoviscidose, ou fibrose kystique du pancréas, est la maladie génétique grave de transmission récessive la plus fréquente dans les populations européennes [95].

En France, un nouveau-né sur 3 500 environ est atteint de mucoviscidose, et la prévalence est de 250 nouveaux cas par an.

En France, la mutation $\delta F508$ représente 70% de l'ensemble de ces mutations [96]. Mais le brassage des populations dans les pays rend illusoire le dépistage de la mucoviscidose en population générale.

C'est pourquoi les recommandations publiées par un groupe d'experts sont [97] :

- les personnes apparentées à un malade doivent se voir offrir un test, de même que les conjoints des malades ;

- une information sur la maladie et une explication sur le dépistage et ses conséquences doivent être données en période anténatale ;
- si le dépistage est réalisé, ce doit être le plus tôt possible dans la grossesse. Ce dépistage est possible dès 11 SA, par un PVC. Le résultat est obtenu en moins d'une semaine.

❖ X-Fragile

C'est la cause la plus fréquente de retard mental héréditaire. L'estimation de la fréquence du syndrome de l'X fragile est de un garçon sur 4 000 et une fille sur 8 000. La fréquence de la prémutation chez les femmes est de 1/259 [98].

Le gène de l'X-Fragile a été identifié en 1992, rendant ainsi plus simple et plus fiable son diagnostic moléculaire et offrant la possibilité d'un dépistage systématique [99].

A l'heure actuelle, le dépistage de l'X fragile n'a été réalisé que dans le cadre de programmes de recherche en Australie, à New York et en Finlande.

En pratique, en France à l'heure actuelle, la bonne stratégie consiste à s'intéresser, par l'interrogatoire des patientes, aux retards mentaux dans la famille, à les identifier et à remonter ainsi chez les patientes à risque en âge de procréer ou en début de grossesse, pour rechercher chez elles la prémutation et leur proposer le DPN.

Les maladies infectieuses :

Des agents infectieux à l'origine de maladies bénignes ou asymptomatiques chez la mère peuvent être transmis au fœtus chez lequel ils peuvent entraîner des lésions parfois irréversibles. La gravité de l'atteinte fœtale est variable selon l'agent infectieux et pour une infection donnée, selon le terme de la grossesse. De façon générale, il faut retenir que les infections en début de grossesse sont graves mais peu fréquentes et, qu'à l'inverse, les infections de fin de grossesse sont peu ou pas graves mais très fréquentes.

C'est dire l'importance de l'établissement individuel du pronostic une fois porté le diagnostic d'infection fœtale.

Pour toutes ces pathologies infectieuses, la sérologie maternelle est capitale puisque, sauf cas exceptionnels (immunodépression), une femme immunisée ne peut pas transmettre un parasite ou un virus.

Le diagnostic d'infection fœtale peut être porté dans 2 circonstances très différentes : dépistage sérologique ou diagnostic clinique d'une infection maternelle, d'une part, diagnostic échographique d'une anomalie morphologique fœtale pour laquelle une étiologie infectieuse est soupçonnée.

Par ordre décroissant du nombre de cas en France, nous allons étudier l'indication d'un prélèvement fœtal devant une toxoplasmose, des infections dues au CMV, aux parvovirus, aux virus de la varicelle et de la rubéole.

Toxoplasmose

La toxoplasmose représente la principale infection parasitaire congénitale.

L'importance de la séroprévalence de l'infection chez les femmes en âge de procréer estimée à 54% a pour conséquence une incidence de près de 2% de la toxoplasmose au cours de la grossesse chez les femmes non immunisées [100].

En cas de séroconversion maternelle, la contamination fœtale est estimée à environ 10 à 30 % des fœtus [101] et le risque de passage transplacentaire est proportionnel à l'âge gestationnel : < 5 % avant 5 SA, > 80 % en fin de grossesse [102]. Inversement, les séquelles fœtales sont d'autant plus importantes que l'infection a été acquise tôt pendant la grossesse.

Les manifestations congénitales de la toxoplasmose sont essentiellement neurologiques et oculaires. Les formes sévères associent hydrocéphalie, retard psychomoteur et chorioretinite maculaire et représentent moins de 10 % des cas. Les formes discrètes se traduisent par des calcifications intracrâniennes sans retard psychomoteur, une hyperalbuminorachie ou une chorioretinite périphérique.

Les formes infra cliniques sont les plus fréquentes (plus de 90 % des cas) mais peuvent se compliquer dans l'enfance, l'adolescence, voire l'âge adulte d'une chorioretinite avec cécité ; d'où l'intérêt d'une surveillance ophtalmologique régulière et prolongée [103].

Si une anomalie échographique permet de porter un diagnostic d'infection sévère qui peut justifier une IMG, une évolution échographique normale ne permet en aucun cas d'exclure une infection fœtale.

C'est pourquoi dès qu'une infection maternelle est démontrée ou fortement suspectée pendant la grossesse, une analyse biologique du LA est indiquée afin de reconnaître une éventuelle transmission de l'infection au fœtus et ainsi de démarrer le traitement spécifique. Ce diagnostic proposé il y a une quinzaine d'années par Daffos comportait un prélèvement de LA et de sang fœtal [104].

L'amniocentèse est effectuée de la 18^e semaine de grossesse à l'accouchement en respectant un délai minimum de 4 semaines entre la date de la séroconversion maternelle et celle du prélèvement du LA, ce qui diminue le nombre de faux négatifs [105]. Les séroconversions tardives du 8^{ème} mois peuvent bénéficier d'une ponction de LA durant le 9^{ème} mois. 20 à 30 ml de LA sont prélevés, en faisant attention à ne pas contaminer le prélèvement par le sang maternel afin d'éviter des éventuels faux positifs.

La recherche du parasite est effectuée conjointement dans le LA par PCR (polymerase chain reaction) et inoculation à la souris (pour pallier les rares problèmes techniques de la PCR) [106]. L'introduction de la PCR a permis un gain très significatif de sensibilité du DPN par rapport aux méthodes conventionnelles. Enfin il faut souligner l'importance d'un DPN précoce et rapide afin d'instituer un traitement spécifique in utero avant que le parasite n'induit des lésions irréversibles [107].

Cytomégalovirus (CMV)

On estime que 1 à 4 % des femmes séronégatives développent une primo-infection durant la grossesse et que l'incidence des infections congénitales varie entre 0,2 et 2 % [108].

L'infection à CMV constitue la cause principale des handicaps neurosensoriels acquis pendant la vie intra-utérine. Chez les femmes immunisées, les réinfections sont fréquentes et s'accompagnent souvent d'une réapparition des IgM et d'une excrétion virale dans les urines qui n'a pas d'incidence majeure.

La prévalence des anticorps sériques anti-CMV chez les femmes en âge de procréer est en moyenne de 60%. Cette séroprévalence est proportionnelle à l'âge et à la parité et inversement proportionnelle au statut socio-économique [109].

A la suite d'une primo infection maternelle, le taux de transmission au fœtus est de 30 à 40%, tandis qu'elle est de 1% en cas de récurrence.

90% des foetus contaminés seront asymptomatiques à la naissance, 10% d'entre eux présenteront un développement anormal avec des séquelles neurosensorielles variables, essentiellement à type de surdité [110].

2 situations se présentent pour le DPN :

- Il existe des anomalies échographiques dont le pronostic est d'emblée péjoratif (atteinte cérébrale : ventriculomégalie, microcéphalie, calcifications), une amniocentèse est pratiquée même en l'absence d'infection maternelle confirmée.

- Il existe des anomalies échographiques dont le pronostic est difficile à établir ; intestin hyperéchogène isolé, RCIU isolé, placenta épais, oligoamnios. Dans ce cas, il est utile de vérifier la sérologie maternelle à CMV. Si celle-ci est négative, il n'y a bien sûr aucune raison de chercher le virus chez le foetus. Si la sérologie est positive et même en l'absence d'IgM, une recherche de CMV doit être proposée d'emblée. . Le vrai progrès réside dans la mesure de l'avidité des anticorps qui permet de savoir si une infection est antérieure ou non à la grossesse [111] et donc de ne pratiquer un DPN qu'à bon escient.

Il y a quelques années, le DPN reposait sur la biologie effectuée sur sang foetal, les formes congénitales étant, de façon générale, accompagnées d'une thrombopénie majeure. Actuellement, le diagnostic repose sur la biologie moléculaire sur LA.

La recherche de CMV sur LA est pratiquée après amniocentèse réalisée au moins 6 semaines après l'infection maternelle, et pas avant 22 SA [112].

Rubéole

Grâce à la vaccination, l'infection rubéolique est devenue rare en cours de grossesse, mais n'a pas encore disparu. L'incidence des rubéoles congénitales est de 4 à 7 pour 100 000 naissances [113]. Le risque de passage transplacentaire est maximal en début et en fin de grossesse. La gravité de l'atteinte fœtale diminue avec le terme. Les embryofœtopathies graves sont le fait d'infections fœtales de la 1^{ère} moitié de la grossesse [114].

Comme la toxoplasmose, la rubéole est souvent peu symptomatique, son diagnostic repose donc sur le dépistage sérologique.

Le DPN de l'infection rubéolique congénitale par prélèvement de LA est indiqué si l'infection maternelle survient dans une période à risque pour le fœtus.

Lorsque l'infection maternelle a eu lieu entre 11 jour après la conception et 18 SA, un bilan de contamination fœtale sera proposé. Avant et au-delà de ce terme, les risques d'anomalies fœtales sont quasi nuls et le DPN invasif n'est pas utile. Une surveillance échographique peut suffire [115].

Le diagnostic de contamination foetale repose comme dans d'autres pathologies infectieuses foetales sur des signes directs et des signes indirects.

Les signes directs de l'infection foetale sont :

- la détection de l'ARN viral en biologie moléculaire sur LA prélevé par amniocentèse [116]. Cette technique permet un diagnostic rapide. Les conditions de prélèvement et de transport sont strictes (LA clair, transport congelé). Elle pourrait être réalisée dès 18 SA ;

- l'accès au sang foetal permet de rechercher les anticorps IgM spécifiques. Cependant, malgré une infection confirmée, la production d'IgM antirubéoliques est inconstante [117].

Parmi les signes indirects, le plus spécifique de l'infection foetale est le dosage de l'interféron foetal (élevé en cas d'infection foetale).

Enfin il semble nécessaire d'évoquer la possibilité d'embryofoetopathie rubéolique devant tout RCIU associé une anomalie cardiaque fœtale.

La varicelle

Au contraire de la rubéole, la varicelle est symptomatique chez l'adulte; le diagnostic de l'infection maternelle est donc clinique. Il s'agit d'une maladie hautement contagieuse induisant une immunité très stable : environ 95 % des femmes enceintes sont immunisées.

L'incidence de la varicelle congénitale est de 1 à 5 cas pour 10 000 grossesses. Sa survenue avant 24 SA peut entraîner des atteintes graves. Globalement, de 0 à 21 semaines, le risque

est d'environ 2 % et ne justifie jamais d'interruption de la grossesse sans DPN préalable. Près du terme, le risque d'infection foetale est de 25 à 30 % [118].

En pratique, devant une séroconversion maternelle avant 20 SA, un prélèvement fœtal à la recherche d'une contamination fœtale ne doit être envisagé qu'en cas d'anomalies échographiques. Ceci justifie une échographie mensuelle ciblée sur le pôle céphalique et les extrémités céphaliques. Les signes les plus caractéristiques sont une aplasie ou hypoplasie des membres, une atteinte oculaire (choriorétinite, cataracte, microphthalmie), des calcifications hépatiques, des atteintes neurologiques variées (microcéphalie, hydrocéphalie). Le diagnostic biologique de varicelle congénitale se fait sur LA : L'émergence de la biologie moléculaire avec les techniques de PCR a permis un progrès important dans le diagnostic de la varicelle. Dès 1991, l'application au dépistage est évoquée et montre une meilleure sensibilité que les cultures cellulaires. Le premier cas de DPN positif est rapporté en 1992.

En pratique, seuls quelques cas diagnostics anténataux positifs ont été rapportés dans la littérature. L'expérience de plusieurs équipes [119] semble montrer qu'un DPN n'est pas intéressant lors d'une varicelle maternelle pour les raisons suivantes :

- le risque d'embryofoetopathie est faible (inférieur à 1 %) ;
- la mise en évidence directe ou indirecte du VZV chez le fœtus ne s'accompagne pas toujours d'un syndrome de varicelle foetale ;
- les anomalies foetales peuvent survenir à distance de la varicelle maternelle lorsqu'elles sont secondaires à un zona in utero ;
- enfin, malgré l'utilisation de la PCR, il peut exister des faux négatifs

Il semble que la meilleure prévention de la varicelle congénitale soit, plutôt que la réalisation de prélèvements ovulaires, la surveillance mensuelle par échographie du fœtus durant toute la grossesse.

Parvovirus

Le parvovirus B19 au cours de la grossesse peut être responsable dans 30 à 40% des cas d'une anasarque foeto-placentaire, complication fœtale grave liée à une anémie profonde ou d'une mort in utero.

La séroprévalence est d'environ 60% chez les femmes enceintes. Les infections surviennent le plus souvent par épidémie.

Le taux de transmission fœtale varie selon le trimestre d'exposition maternelle. Il est estimé à 0 en période périconceptionnelle, 14 % à la fin du 1^{er} trimestre, 50 % à la fin du 2^{ème}, et plus de 60 % au 3^{ème} trimestre.

Les conséquences sur le fœtus ont été mieux évaluées grâce aux travaux de Miller qui a suivi de façon prospective 427 femmes ayant fait une infection à parvovirus [120].

Il n'y a pas de risque tératogène décrit dans l'ensemble de la série. Le taux de pertes fœtales (PF) est nettement accru lors des infections avant 20 SA (15 % contre 5 % dans une population témoin). Un taux qui inclut le risque de fausse couche précoce, qui semble légèrement accru, et le risque de mort in utero par anémie aiguë. Lors des infections après 20 SA, le risque de PF n'est pas augmenté dans cette étude. La survenue d'une anasarque foetoplacentaire complique dans la série de Miller 1,7 % des infections maternelles. Dans cette même série, toutes les anasarques surviennent après une infection maternelle entre 11 et 18 SA avec un délai d'apparition de 11 à 17 semaines après l'infection. Une myocardiopathie peut s'associer à l'atteinte fœtale hématologique et entraîner une défaillance cardiaque foetale. Rodis [121] rapporte le devenir de 539 cas d'anasarques foetoplacentaires secondaires à une infection à parvovirus, à partir d'une enquête auprès des membres de la Société des obstétriciens périnatologistes d'Amérique du Nord. Les anasarques ont été dépistées entre 16 et 36 SA avec une grande majorité au 2^{ème} trimestre, et environ 8 à 12 semaines après l'infection maternelle. L'évolution rapportée des anasarques est de 30 % vers la mort in utero, 34 % vers une résolution spontanée, 29 % vers une résolution après transfusion in utero et 6 % de mort in utero malgré transfusion.

Même si cette étude rétrospective est très hétérogène, elle a le mérite de sa taille et permet de constater que parmi les fœtus ayant reçu des transfusions in utero la survie est de 84 %. Le délai de résolution des signes échographiques d'anémie foetale est dans cette étude d'au plus 6 semaines. Aucune information n'est apportée sur les anasarques du 3^{ème} trimestre, entité rare. Le suivi à long terme des enfants ayant été infectés in utero est bon. Il n'y a pas de séquelles sur le développement à long terme.

Le diagnostic de l'atteinte fœtale repose sur la sérologie. En cas d'infection maternelle prouvée (les anticorps de type IgM apparaissent 3 à 4 jours après le début clinique de la maladie), la plupart des auteurs recommandent la mise en place d'un suivi échographique (hebdomadaire) et suffisamment prolongé (6 à 8 semaines) pour dépister les 1ers signes d'hydrops fœtal. Parallèlement, une amniocentèse est pratiquée pour la mise en évidence du génome par PCR, tout en sachant qu'elle ne peut pas renseigner sur le degré d'anémie induite par l'infection au parvovirus. La sérologie avec recherche d'IgM antivirus du parvovirus dans le sang fœtal ou de cordon n'est pas fiable puisqu'elle a une sensibilité inférieure à 50 %.

Ainsi, dès la découverte d'une anasarque à l'échographie, une PSF confirmera le diagnostic en constatant une anémie sévère plus ou moins régénérative selon le moment du prélèvement et permettra de corriger cette anémie par transfusion in utero.

Plusieurs auteurs ont rapporté des succès thérapeutiques, aboutissant ainsi à une guérison sans séquelles néonatales [122,123].

En l'absence de tout traitement in utero, l'évolution se fait dans 10 à 30 % des cas vers la mort fœtale [123]. Il faut savoir que dans de nombreux cas, l'anasarque se résout spontanément, sans intervention et les enfants naissent normaux. Dans les cas les plus sévères, une prise en charge précoce et adaptée en centre spécialisé peut permettre une guérison totale et sans séquelle des foetus atteints.

LES TECHNIQUES

Le prélèvement est réalisé dans un local réservé aux prélèvements fœtaux, dans des conditions d'asepsie rigoureuse, les exceptionnelles complications maternelles graves, comme nous le verrons par la suite, pouvant aller jusqu'au décès maternel, sont exclusivement d'origine infectieuse.

Tout prélèvement fœtal doit être précédé d'une consultation spécifique, comportant :

- une information claire, loyale et objective sur les bénéfices attendus du geste, sur les risques encourus par le fœtus et la mère et sur les découvertes fortuites liées au geste (par exemple un syndrome de Turner)
 - une vérification du groupe sanguin, la recherche d'agglutinines irrégulières ainsi que des sérologies récentes pour la toxoplasmose, la rubéole, hépatite B, hépatite C, le virus de l'immunodéficience humaine et le cytomégalovirus.
 - la proposition d'un soutien psychologique en cas de dépistage d'une fragilité d'un des membres du couple d'autant plus que l'on suspecte un parcours long pouvant déboucher sur une IMG.
- la réalisation d'un dossier de diagnostic anténatal.

Les différentes techniques des prélèvements fœtaux ne sont pas concurrentes, mais sont au contraire complémentaires les unes des autres, le choix doit être fait de telle façon que l'information soit la meilleure possible avec le maximum de sécurité.

L'AMNIOCENTESE

Depuis le premier caryotype réalisé à partir d'un échantillon de liquide amniotique en 1965, l'amniocentèse ou prélèvement de LA s'est imposée comme la plus simple et la plus répandue des techniques d'accès au fœtus. L'amniocentèse consiste à prélever du LA dans le but de déterminer et de détecter des anomalies moléculaires et biochimiques.

Bases physiologiques

La cavité amniotique (figure 3) apparaît au 13^{ème} jour qui suit la fécondation. Son volume augmente progressivement au cours de la grossesse: il est d'environ 200ml à 16 SA et se compose essentiellement d'un ultrafiltrat du plasma maternel, puis atteint un maximum à 34 SA (1000ml) où les apports de l'urine et du poumon fœtal sont en équilibre

avec la déglutition. Puis le volume décroît vers la fin de grossesse allant de 800ml à 40 SA à 550 à 42 SA [124].

Elle contient des amniocytes et des cellules provenant de la desquamation des cellules épidermiques fœtales, qui permettent après culture, la réalisation du caryotype.

Même si le LA contient plus de 200 cellules / ml à 16 SA, seulement un petit nombre de cellules ($3,5 \pm 1,8$ cellules/ml de LA) est capable de se cultiver et de produire des colonies. Les cellules dérivant du LA de la 24ème à la 32ème SA montrent un déclin significatif dans l'efficacité de la culture ($< 1,5$ clones/ml de LA).

Ceci montre l'intérêt de bien choisir le moment opportun pour le prélèvement.

En raison de la persistance du coelome extra embryonnaire au premier trimestre de grossesse, l'amnios n'est pas encore accolé au chorion rendant la réalisation de l'amniocentèse délicate à cette période.

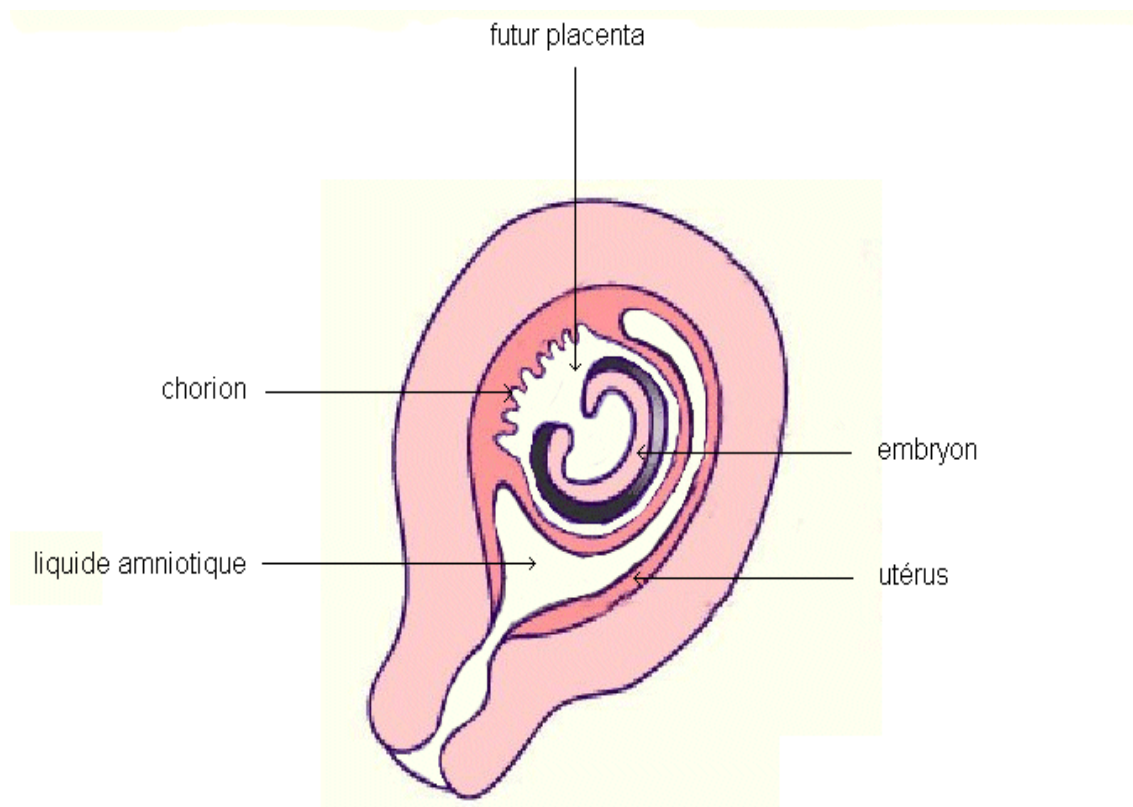


Figure 3 : cavité amniotique

Terme

L'amniocentèse est classiquement réalisé à partir de 11SA jusqu'au terme de la grossesse [125] et l'on peut distinguer :

- l'amniocentèse précoce entre 11 et 14 SA
- l'amniocentèse classique entre 15 et 20 SA
- l'amniocentèse tardive au delà de 20 SA

Sur le plan pratique, les deux dernières sont peu différentes, se distinguant seulement par un rapport moins favorable entre volume fœtal et volume du LA après 20 SA. La période optimale pour sa réalisation se situe entre 15 et 17 SA car c'est au cours de celle ci que ce rapport est le plus propice et que la proportion d'amniocytes et de cellules fœtales desquamées vivantes est la plus importante [125].

L'amniocentèse précoce tire ses indications de la nécessité d'obtenir un résultat plus tôt au cours de la grossesse (permettant éventuellement une IMG avant la perception maternelle des premiers mouvements actifs fœtaux). Elle est de réalisation plus délicate car à ce terme la quantité de LA est plus faible et l'amnios n'est pas encore accolé au chorion en raison de la persistance du coelome extra embryonnaire [126].

Bien que des amniocentèses aient été décrites avant 12 SA, la fréquence des complications et des échecs de culture à un terme précoce doivent faire recourir à un autre type de prélèvement à ce terme [127].

Il n'y pas de limite supérieure. Le prélèvement peut être pratiqué en fin de grossesse, mais le retard au diagnostic fait porter, en cas de décision d'interruption de grossesse, des risques physiques et émotionnels très importants à la femme.

L'amniocentèse tardive garde une seule indication : c'est la découverte tardive de malformations fœtales à l'échographie de 3^{ème} trimestre.

Matériel

- un badigeon chirurgical
- champs stériles
- un sac de protection stérile pour la sonde d'échographie
- du gel de contact stérile
- des seringues à usage unique (une de 2 ml, 2 de 10 ml plus facile à remplir qu'une de 20 ml)
- un flacon de mise en culture type tube " Falcon "
- une aiguille de type ponction lombaire de diamètre 0.9 mm (20 G) de 9 cm de long ou une aiguille spécifique à amniocentèse (aiguille de Wallace) de même diamètre mais disponible en plusieurs longueurs : 9, 12, 15cm. Cette dernière a comme avantage de procéder une extrémité légèrement striée, échogène, permettant son repérage échographique plus facile.

Technique opératoire (figure 4)

a- c'est un geste réalisé en ambulatoire; patiente non à jeûn; une prémédication, une anesthésie locale, la prescription de tocolytiques ne sont pas nécessaires. L'efficacité d'une antibioprophylaxie pour réduire le taux de fausses couches après amniocentèse est inconnue. Son utilisation n'est pas recommandée, même si de nombreuses complications de la technique sont dues à une éventuelle infection.

b- réalisation d'une échographie permettant de vérifier la vitalité fœtale, le terme, la quantité de LA, la position du placenta, l'accessibilité d'une citerne amniotique pour la ponction en évitant un passage trans placentaire si possible.

c- désinfection cutanée de la paroi abdominale selon les protocoles du CLIN.

La sonde d'échographie est isolée dans un sac stérile, et le contact avec la peau est assuré par le gel stérile

d- choix du site de ponction : il faut s'efforcer de ponctionner le plus haut et médian possible sur l'utérus car cette région est moins douloureuse et expose moins au risque d'hydrorrhée post amniocentèse, le repérage est facilité par une sonde mise dans un axe sagittal,

e- Après repérage échographique de la plus grande citerne amniotique, le trocart ou l'aiguille est introduite à travers la paroi abdominale, sous contrôle échographique continu,

le passage des membranes doit être franc et rapide pour éviter de refouler l'amnios au devant de l'aiguille sans le traverser (surtout en cas d'amniocentèse précoce lorsque le coelome extra embryonnaire est encore présent). 2 cas de figures sont possibles [5] :

- soit selon la " free hand technique " où un aide se concentre sur l'échoguidage pendant que l'opérateur réalise le prélèvement,

- soit le même opérateur tient d'une main la sonde et de l'autre aiguille, il demande alors à un aide d'aspirer le liquide, cette méthode permet une meilleure coordination entre repérage et ponction,

f- retrait du mandrin et aspiration avec la seringue de 2 ml : le 1^{er} ml de LA aspiré sera jeté afin d'éviter la contamination du prélèvement par des cellules maternelles,

g- prélèvement de 1 ml de liquide amniotique par SA (avant 15 SA) ou 20 ml après ce terme, adressé au laboratoire rapidement protéger de la lumière par du papier aluminium,

h- retrait de l'aiguille d'un geste rapide après avoir remis en place le mandrin : ce geste est d'autant moins douloureux qu'il est effectué après avoir lâché l'aiguille pour qu'elle indique l'axe du retrait,

i- vérification de l'activité cardiaque fœtale

j- surveillance de une à deux heures

Compte-rendu :

Il est important de noter la quantité de liquide prélevée, sa couleur, la réalisation d'une ponction transplacentaire, l'existence et la durée d'un saignement ovulaire.

En cas de ponction sur une grossesse gémellaire, la réalisation d'un schéma est indispensable. Il convient également de noter si les prélèvements ont été effectués par une seule ou deux ponctions.

Contre-indications :

Il s'agit en fait plus de limites techniques que de véritables contre-indications de la méthode. L'expérience de l'opérateur joue ici un rôle capital. De plus, dans la majorité des cas, ces contre-indications ne concernent que les amniocentèses précoces et sont temporaires [128]. Il s'agit principalement de :

- obésité maternelle majeure

- volumineux fibromes antérieurs avec interposition sur le trajet de l'aiguille
- interposition de la vessie ou de l'intestin en cas d'utérus retroversé

Les infections virales maternelles (hépatite B, hépatite C, VIH) ne sont pas de véritables contre-indications à l'amniocentèse. Il existe cependant un risque non négligeable de contamination en cas de virémie maternelle [129]. De plus, il existe également un risque de positiver faussement un prélèvement de LA en l'absence d'infection fœtale, comme dans le CMV par exemple où la négativité de la virémie maternelle est souhaitable avant une amniocentèse.

Il est important dans ces cas-là de discuter avec les parents du rapport bénéfice/risque. Le risque global pour le VIH, pour autant qu'on puisse le savoir, serait multiplié par deux par rapport au risque de contamination en dehors de tout geste obstétrical. Ainsi, en reprenant les observations de l'enquête périnatale française série portant sur 1640 femmes non traitées et leurs enfants [130], le taux de transmission a été de 28,95 % (22/76) en cas de gestes obstétricaux contre 15,79 % (247/1564) dans le cas contraire, différence qui s'avère significative malgré le faible effectif de l'échantillon des mères ayant fait l'objet d'actes obstétricaux. Cependant il faut souligner dans cette étude qu'aucun traitement n'encadrerait le geste. Les méthodes les plus invasives, comme les PVC et les PSF, devraient être évitées au bénéfice de l'amniocentèse.

En cas de séropositivité VIH et d'amniocentèse indispensable, une prophylaxie antirétrovirale est indiquée. Elle peut se limiter à prescrire de la zidovudine par voie orale en commençant si possible deux semaines environ avant l'amniocentèse et par perfusion au cours de l'acte. Si la femme a une charge virale élevée, on peut envisager une bi voire une trithérapie encadrant l'amniocentèse.

De plus, en cas de séropositivité pour le VIH, il faut absolument éviter de ponctionner en trans placentaire.

Cas particuliers

–hydramnios :

En cas d'analyses cytogénétiques, l'effet de dilution des amniocytes doit faire prélever une plus grande quantité de LA (100 à 200 ml en fonction de l'importance de cet hydramnios), elle permet en outre un amniodrainage permettant de lever la surdistension utérine.

- oligo ou anamnios :

On peut réaliser préalablement une amnio-infusion, cependant il existe un risque important d'échec de culture cellulaire. Dans ce cas le PSF doit être préféré.

- rhésus maternel négatif :

Une prévention de l'allo-immunisation maternelle est impérative par injection d'immunoglobulines anti-D

- allo immunisation maternelle connue :

Le risque de réactivation de l'allo-immunisation est réel. L'injection d'anti D n'est pas utile.

- ponction transplacentaire :

Si le placenta est antérieur, on introduit le trocart le plus loin possible de l'insertion du cordon afin d'éviter un gros vaisseau de la plaque chorale et la contamination sanguine de LA, et ce, d'autant plus que le terme est tardif. En effet, il a été montré que le passage transplacentaire expose au risque de saignement d'un vaisseau placentaire et donc d'un LA hémorragique que les cytogénéticiens interprètent avec davantage de difficultés en raison du risque de contamination du prélèvement par des cellules maternelles. La région de la plaque chorale doit donc être évitée en raison de sa richesse en vaisseaux.

Bien que les résultats d'études déjà publiés sur l'amniocentèse transplacentaire, au début discordants, ne font plus part d'un risque de fausse couche plus élevée [131], ils ont cependant indiqué un risque accru de transfusions de la mère au fœtus [132,133].

- obésité :

Le prélèvement sera plus tardif afin de faciliter le repérage. Il faut utiliser des aiguilles de même diamètre, mais plus longues, 12 ou 15 cm.

- ponction transvaginale :

Shalev et al [134] ont décrit une ponction de LA par voie transvaginale :

La ponction est alors réalisée sous le contrôle d'une sonde d'échographie endovaginale.

Sur 356 ponctions effectuées entre 10 et 12 SA, un seul échec est noté (0,3 %). L'aiguille (20 cm de long, 0,7 mm de diamètre : 21 G) est dirigée dans l'amnios sous guidage d'une sonde vaginale de 6,5 MHz. Il y eut six pertes fœtales dans les deux semaines suivant la technique (1,7 %).

Cette voie ne semble pas présenter d'avantages évidents sur la voie abdominale pratiquement toujours utilisable. Elle est pratiquement abandonnée.

– LA hémorragique

Normalement, le LA ressemble à de l'urine diluée. Il peut être teinté de sang, le plus souvent en raison d'un saignement maternel dans la cavité au moment de l'intervention. La présence d'un LA décoloré lors de l'amniocentèse représente un risque accru de perte de grossesse [135]. Un LA fraîchement teinté de sang doit être analysé séparément au moyen d'un test de kleihauer et d'une numération cellulaire afin de savoir si le nouveau sang est d'origine maternelle ou fœtale. S'il s'agit de sang fœtal, il se peut que l' α FP soit élevée, en l'absence d'une étiologie révélant une anomalie congénitale. Selon la recommandation des directives cliniques de la SOGC, une prophylaxie pour la maladie Rh doit être administrée si la patiente est Rh négative [136].

– contact fœtus-aiguille

Il arrive parfois que le fœtus vienne secondairement au contact de l'aiguille empêchant ainsi l'aspiration du LA. Lorsque le fœtus ne s'éloigne pas spontanément, on peut être amené à le mobiliser par des manœuvres externes douces, à tourner l'aiguille sur elle même, voire à la retirer. Il est recommandé de ne pas pratiquer plus de deux insertions d'aiguilles dans la paroi utérine. Si l'intervention ne réussit pas, il faut attendre au moins 24 heures avant de faire une autre tentative. La possibilité de voir en permanence la pointe de l'aiguille a considérablement diminué le nombre de blessures fœtales, mais des accidents, en particulier cérébraux [137] sont encore exceptionnellement décrits et incitent à rester très concentré pendant tout le prélèvement. Le retour à domicile est autorisé après une courte période de repos. La patiente est bien informée de l'importance de limiter son activité pendant les 24 heures qui suivent le prélèvement, mais l'efficacité de cette réduction de l'activité dans la prévention du risque de perte fœtale n'a pas été bien étudiée. Il est recommandé de consulter un médecin au moindre signe d'alerte, en particulier en cas de pertes liquidiennes inhabituelles par le vagin.

Les échecs de ponction

Les échecs de ponction sont rares et se situent en moyenne entre 0,5 et 1% [138] et est fonction du :

❖ Terme :

Avant 12 SA, même si le sac amniotique est aisément repérable, l'existence de la cavité extra cœlomique rend l'accès au LA difficile et ce, d'autant que les membranes ne sont souvent pas accolées. Il est donc préférable d'attendre 11–12 SA.

❖ Limites techniques :

–obésité maternelle majeure

–utérus comportant de volumineux fibromes antérieurs pouvant s'interposer sur le trajet de l'aiguille

–interposition de la vessie et de l'intestin qui se rencontrent en cas d'utérus rétroversé et qui ne sont que temporaires

–mauvaise visualisation échographique de la cavité amniotique (anamnios)

Mais, pour la majorité des auteurs, ces échecs ne représentent pas plus de 2% des amniocentèses réalisées avant 15 SA.

❖ Nombre de tentatives de prélèvement (tableau 5).

Dans un certain nombre de cas, plusieurs tentatives de prélèvement s'avèrent nécessaires :

–Avant 15 SA, le taux d'échec après la 1ère tentative se situe entre 0% à 4,1%, il est de 0 à 3,1% à la 2ème tentative.

–Après 15 SA, le taux d'échec est moindre, autour de 0,3 % après une 1ère tentative.

En cas d'échec, la patiente est généralement reconvoquée au moins 24 heures après pour une nouvelle tentative.

Les dernières études ont montré alors un taux de réussite de 100% à la deuxième tentative.

Tableau 5 : Amniocentèse avant 15 SA. Taux de réussite

Auteurs	PLA	1er essai (%)	2e essai (%)	PLA 17 SA (%)
Patil et al [140]	335	98,8	100	
Elejalde et al [141]	615	96,7	100	
Strippario et al [142]	505	99,4	100	
Nevin et al [143]	222	100		
Hanson et al [144]	936	96,9	96,9	100
Kerber et al [145]	430	99,8		
Buscaglia et al [146]	758	98,2	100	

Rousseau, Boulot et al [147]	241	95,9	98,3	100
Diaz Vega et al [139]	181	98,4		
Thoulon et al [125]	553	97,6	99,1	99,6
PLA : prélèvement de liquide amniotique.				

Les échecs de culture

Les échecs de culture sont rares et dépendent de plusieurs facteurs :

a -en raison du terme :

Les échecs de culture représentent environ 1% des amniocentèses à un terme < 15 SA [148]. Ces échecs sont d'autant plus fréquents que le terme est précoce (< 12 SA) [148]. Parfois au delà de 28 semaines des difficultés de culture sont rencontrées du fait d'une plus faible proportion d'amniocytes vivants.

b- En raison d'une contamination maternelle :

L'inclusion de cellules maternelles dans la culture de LA peut entraîner une erreur ou des difficultés diagnostiques.

Pour diminuer ce taux il faut éliminer le début de recueil du LA.

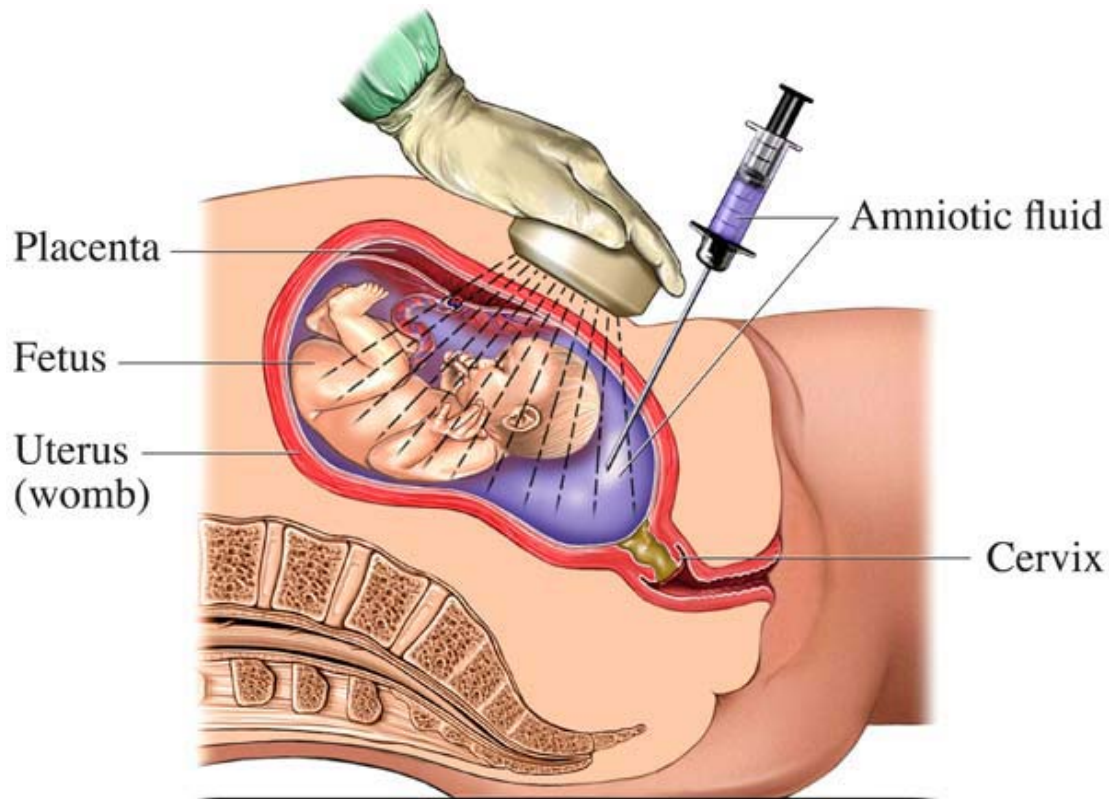
3- En raison d'une difficulté d'interprétation

Les mosaïques et pseudo mosaïques sont rares à 18 SA : 0,2%, elles sont l'apanage des prélèvements plus précoces : avant 13 SA, 0,28% de vraies mosaïques et 5,04% de pseudo mosaïques [149].

Conclusion

L'amniocentèse est le prélèvement fœtal le plus simple et comportant le moins de risque de perte fœtale. Les progrès réalisés dans les techniques de laboratoire tendent à en faire de plus en plus le prélèvement universel en dehors de quelques indications spécifiques.

Figure 4 : Amniocentèse



CHORIOCENTESE

Définition

Développé en France depuis 1982, le prélèvement des villosités choriales (PVC) est la technique de DPN qui consiste à prélever des tissus choriaux à partir du placenta en développement. Il s'agit de la technique la plus fréquemment utilisée au 1^{er} trimestre pour l'évaluation du caryotype foetal et des anomalies moléculaires et biochimiques.,

Rappels embryologiques

Six jours après la fécondation, l'œuf s'implante dans la cavité utérine. Au moment de la nidation, il se compose d'une masse cellulaire centrale le bouton embryonnaire, et d'une couronne périphérique, le trophoblaste, qui apparaît dès le 5^{ème} jour. La masse cellulaire centrale donne l'embryon lui même et le mésoderme extra embryonnaire. Le trophoblaste se divise en 2 couches : une couche interne, le cytotrophoblaste, et une couche externe, le syncytiotrophoblaste. Ce dernier forme, dès le 13^{ème} jour, des travées qui s'enfoncent dans l'endomètre et qui sont séparées par des lacunes, ébauches de la chambre intervillieuse. Les

travées syncytiales, colonisées à partir du 15ème jour par un axe cytotrophoblaste, donnent les villosités primaires. Ces derniers perforent les vaisseaux maternels dont le contenu se répand dans les lacunes : ainsi se constitue la circulation utéro placentaire. L'apparition d'un axe mésenchymateux constitue l'ébauche de la circulation fœtale. Les villosités, devenues villosités tertiaires, se multiplient rapidement en plongeant dans les espaces intervillex, permettant les échanges sanguins fœtaux maternels.

Au début de la grossesse, les villosités entourent complètement l'œuf, mais la plupart régresse puis disparaît. Seules les villosités de la région du bouton embryonnaire se développent pour donner le chorion villex et le placenta.

Les techniques de DPN chromosomique reposent sur l'analyse de prélèvements effectués au niveau du chorion villex. Les villosités choriales sont formées de 3 composantes : une couche externe formée par le syncytiotrophoblaste une couche moyenne composée de cytotrophoblaste et une couche interne formée par un axe mésenchymateux dérivant directement du bouton embryonnaire.

Les techniques directes vont étudier les cellules cytotrophoblastiques (car elles ont un index mitotique élevé) alors qu'avec les techniques de culture villositaire le caryotype est obtenu à partir de cellules mésenchymateuses. Comme le cytotrophoblaste dérive du trophoblaste et que le mésenchyme provient de la masse cellulaire, la villosité a une double origine ce qui explique la possibilité de mosaïques.

Bases physiologiques

Jusqu'à 10 SA, le chorion et l'amnios sont séparés par la cavité coelomique extraembryonnaire qui diminue et s'oblitére entre 10 et 13 semaines avec la fusion des deux membranes.

Après 10 SA, les villosités choriales ne persistent en abondance que sur le site du futur placenta. Les villosités sont des formations ramifiées autour d'un axe conjonctivo vasculaire formant le chorion et entourées d'une double couche cellulaire trophoblastique; à l'intérieur le cytotrophoblaste avec des cellules prolifératives et à l'extérieur le syncytiotrophoblaste peu mitotique et hormonosécrétant.

Les cellules du fœtus et du trophoblaste dérivent des mêmes cellules ovulaires initiales et ont donc le même patrimoine génétique hormis les rares cas de mosaïques.

Les cellules du cytotrophoblaste peuvent être contaminées par des cellules maternelles de la décidue et de la caduque. Il faut donc trier les villosités sous une loupe binoculaire à fort grossissement. Ensuite, les mitoses sont observées directement après incubation pendant 24 à 72 heures. Pour une interprétation aisée, le volume du prélèvement doit être de 10 à 20 mg. Une culture est faite pour établir définitivement le caryotype.

L'étude directe des mitoses se fait à partir du cytotrophoblaste dont les cellules ont un index mitotique élevé permettant l'analyse chromosomique. En revanche, les cellules cultivées dérivent du noyau mésodermique. Les discordances cytogénétiques observées entre l'examen direct et l'examen après culture, s'expliquent par les différences d'origine des cellules et par une non disjonction postzygotique qui se produit pendant l'embryogenèse. En combinant les deux méthodes : analyse directe et culture, on se met à l'abri de la plupart des erreurs.

Terme

Le PVC ne doit pas être pratiqué avant 10 SA en raison du taux important d'avortement [150]. Le terme idéal se trouve entre 12 et 13 SA [151].

Matériel

- champs stériles
- un badigeon chirurgical
- sac de protection stérile pour sonde d'échographie et gel de contact stérile
- 20 ml de xylocaïne à 1% non adrénalinée pour anesthésie locale et une aiguille IM
- 3 seringues : une de 20ml pour l'anesthésie locale, une de 10ml pour hépariner l'aiguille de prélèvement, une de 20ml ou 50ml pour l'aspiration du trophoblaste
- une aiguille de prélèvement (18 G) héparinée
- une coupelle contenant 10 ml de milieu de culture
- un flacon de transport contenant du milieu de culture

- héparine diluée au 10 000UI/ml : 10 ml

Techniques (figure 5)

En cas de prélèvement par voie vaginale ou d'incertitude sur la voie d'abord, un prélèvement vaginal doit être réalisé à la recherche de germes pathogènes et un traitement par Rulid pendant les 5 jours précédents le prélèvement doit être prescrit.

Un examen échographique pré opératoire est indispensable, il confirme :

- le terme de la grossesse par mesure de la LCC,
- le caractère unique de la grossesse,
- la vitalité embryonnaire (rythme cardiaque fœtal),
- les anomalies morphologiques indiquant le prélèvement (CN, hygroma coli...),
- la localisation du trophoblaste et surtout son accessibilité : ce qui conditionnera la voie d'abord utilisée,

Une injection de gammaglobulines anti-D est pratiquée chez toutes les patientes rhésus négatif,

Bien que, à l'origine, cette technique ait été conçue comme une technique transcervicale, deux méthodes, l'une transcervicale et l'autre transabdominale, sont, depuis peu, devenues possibles.

6-1 La choriocentèse par voie trans-cervicale :

a-La patiente n'est pas à jeun, on peut lui administrer une prémédication en cas d'anxiété importante.

b-Le prélèvement est réalisé soit au bloc opératoire, soit dans une salle spécifique préparée à cet effet et réservée pour les gestes invasifs obstétricaux.

c-La patiente est installée en position gynécologique.

d-Préparation vaginale avec antisepsie chirurgicale en 5 temps selon le protocole du CLIN.

L'antiseptique de choix est la chlorhexidine pour son absence de toxicité cellulaire sur les prélèvements.

e-L'habillage est chirurgical avec port d'un masque, d'un bonnet, de sur chaussures, d'une casaque et de gants stériles. Mise en place de champs stériles.

f-Un aide repère le trophoblaste par une échographie réalisée par voie abdominale, sa zone la plus épaisse correspondant au futur placenta et au site de prélèvement, on repère

l'insertion funiculaire. Le remplissage vésical doit être intermédiaire pour permettre une bonne fenêtre acoustique sans gêner le prélèvement en refoulant l'utérus.

g-L'opérateur met en place un spéculum, le plus souvent une pince de Pozzi est nécessaire pour corriger une éventuelle anté ou rétroversion utérine.

h-La pince à prélèvement ou le cathéter avec dispositif d'aspiration est introduite dans l'axe du plan de coupe échographique pour obtenir un contrôle échographique permanent.

i-Le prélèvement est réalisé dans la partie la plus épaisse du trophoblaste à distance de l'insertion du cordon. La pince saisie la villosité à son pied est on pratique un " stripping " ramenant l'arbre villositaire arborescent.

j-On trie en séparant les caillots des villosités choriales. La quantité nécessaire est d 'environ 5 à 15 mg mais peut parfois être plus importante en cas d'étude en biologie moléculaire.

k-Si le matériel est insuffisant la même procédure est réalisée. On limite le nombre de prises à 3.

l-Le prélèvement doit être protégé de la lumière (papier aluminium) et parvenir rapidement au laboratoire en restant à l'abri des variations de température (incubateur).

m-Contrôle au spéculum de l'absence de saignement endocervical actif.

n-Contrôle échographique de la zone de prélèvement (hématome, saignement...) et de la vitalité embryonnaire.

o-Prophylaxie par gammaglobulines anti-D si rhésus négatif.

p-Retour à domicile après deux heures de surveillance.

7-1 La choriocentèse par voie abdominale :

Elle connaît depuis quelques années un développement indiscutable qui tient à la fois à sa simplicité, à son efficacité et à son innocuité.

La différence avec la voie transcervicale réside dans le repérage et la ponction :

a- On repère le trophoblaste, sa zone la plus épaisse correspondant au futur placenta et au site de prélèvement, on repère l'insertion funiculaire.

b- On introduit sous contrôle échographique permanent (sonde tenue par l'opérateur), dans le plan de la sonde, l'aiguille préalablement héparinée, dans le trophoblaste, en restant

parallèle à la plaque chorale. Pour être mieux vu, le biseau doit faire face au faisceau des ultrasons.

c- On réalise conjointement :

- une aspiration par une dépression de 10 cm³ dans une seringue de 50cc contenant 2 à 3 ml de milieu de culture ou de transport, reliée à l'aiguille par un prolongateur souple (rôle de l'aide).

- des mouvements de va et vient dans le grand axe du trophoblaste, en prenant soin de respecter l'amnios et de ne pas franchir la caduque maternelle sous risque de contamination du prélèvement par des cellules maternelles. 2 à 3 aller retour suffisent en moyenne (rôle de l'opérateur).

Avantages du PVC

- L'avantage principal du PVC est qu'il se pratique à un âge gestationnel précoce, ce qui permet d'avoir des résultats très tôt dans la grossesse. Si une anomalie chromosomique ou de l'ADN est détectée et que la patiente demande une interruption de grossesse, certains des effets physiques ou émotionnels pénibles entraînés par l'interruption de grossesse peuvent être moindres que lorsque celle-ci fait suite à une amniocentèse pratiquée à un âge gestationnel plus avancé.

- Un 2^{ème} avantage est lié aux diagnostics précis qui sont possibles lorsque l'ADN est extrait directement des villosités, permettant des résultats plus précoces sans devoir faire de cultures cellulaires pour des anomalies génétiques.

- Enfin, le 3^{ème} avantage est qu'il peut être possible de faire une analyse chromosomique directe, dans certaines situations, permettant des résultats rapides en moins de 24 heures, soit par une technique cytogénétique, soit par FISH.

PVC transabdominal VS PVC transcervical

Le choix de la technique dépend de nombreux facteurs qui tiennent à l'opérateur et aux particularités de la grossesse considérée.

L'expérience de l'opérateur est un élément fondamental dont dépendent étroitement le succès du prélèvement et son innocuité [152]. Il semble nécessaire de maîtriser à la fois les voies d'abord transabdominale et transcervicale dans la mesure où leurs indications se complètent, la voie transcervicale étant utile lorsque le trophoblaste est postérieur, surtout si l'utérus est antéversé [153]. La technique transcervicale et la technique transabdominale obtiennent toutes deux, normalement, un échantillon de 5 à 25 mg de tissu chorial. Une quantité adéquate de villosités chorales est généralement obtenue par une seule aspiration, mais deux tentatives n'augmentent pas le risque de perte après l'intervention [154].

La précision du PVC est semblable, qu'il soit fait par voie transabdominale ou par voie transcervicale. La technique transcervicale entraîne un plus grand risque de saignements légers après l'intervention (10–20%) [155], alors que la technique transabdominale entraîne davantage de malaises utérins et de crampes [156]; Chez un nombre important de patientes ayant subi un PVC transcervical, on n'a pas signalé le risque d'infection comme étant un facteur important [157].

Ces méthodes peuvent aussi s'appliquer aux grossesses multiples, comme en témoigne une étude multicentrique [158] qui rapporte une série de 124 grossesses gémellaires et 2 grossesses triples avec un taux de succès de 99,2%. La difficulté majeure est d'individualiser avec certitude le trophoblaste correspondant à chacun des fœtus avant de réaliser le prélèvement [159]. Un petit nombre de centres rapportent que le PVC pour les grossesses gémellaires est sécuritaire et précis. [160,161]. Des instruments distincts devraient être utilisés pour prélever des échantillons dans le cas d'une grossesse multiple.

Problèmes rencontrés en cytogénétique

Les caryotypes établis à partir de PVC ne reflètent pas toujours la constitution chromosomique du fœtus. Des cas de faux négatifs, de contaminations par des cellules maternelles et d'anomalies chromosomiques confinées au placenta sont en effet rencontrés.

9-1 Fiabilité de la technique

Le taux de faux négatifs varie dans la littérature de 1/1000 à 1/10000 et celui de faux positifs est d'environ 0,15% [162,163].

–Les faux positifs se rencontrent à l'examen direct mais aussi parfois après culture. Il s'agit fréquemment d'aneuploïdies rares, non viables, telles que des trisomies 2, 7, 12, 16, 22 ou des tétraploïdies [164].

Ces trisomies pures (et non en mosaïque) sont toujours confinées au placenta. Il faut donc être prudent devant des anomalies de nombre inhabituelles et réaliser systématiquement une amniocentèse de contrôle, même si l'examen direct et la culture sont concordants. Par contre, pour un caryotype à 47 + 21, le risque de faux positif est quasi inexistant (breed 1990)

Dans une étude collaborative américaine portant sur 11473 PVC, aucun faux positif n'a été retrouvé concernant les trisomies classiques 21, 13 et 18 [165].

–Les faux négatifs sont exceptionnels et concernent presque exclusivement l'examen direct. Au vu de ces résultats on pourrait être tenté de ne réaliser que des cultures, mais on sait que ces dernières favorisent le risque d'erreur due à une contamination par des cellules maternelles et surtout que dans la majorité des cas les techniques directes apportent une réponse rapide et fiable.

Ainsi, bien que ce phénomène soit généralement limité au tissu placentaire et qu'il ne soit pas généralement présent dans le fœtus, il est recommandé de pratiquer une amniocentèse supplémentaire pour approfondir l'évaluation [166]. Cette intervention additionnelle pourrait augmenter le risque de complications. Les effets cliniques du mosaïcisme placentaire confiné peuvent varier selon le chromosome affecté. Dans cette situation, il faut être à l'affût d'une disomie monoparentale et des risques d'anomalies placentaires entraînant un RCIU et la mort fœtale.

9-2 Contamination maternelle

La contamination par le tissu caduc maternel est possible, mais ce risque possible peut être minimisé en s'assurant de nettoyer ou de retirer très soigneusement les villosités choriales des cellules caduques maternelles sous un microscope de dissection avant de faire la culture

du tissu. Ce problème ne s'est pas avéré important dans la plupart des laboratoires cytogénétiques ayant une longue expérience en PVC.

9-3 Mosaïcisme placentaire confiné

Le mosaïcisme placentaire confiné, une discordance entre les chromosomes des tissus choriaux et fœtaux, est un facteur biologique placentaire présent dans 1 à 2% des grossesses [167].

Conclusion

Avantages :

- La précocité du prélèvement permettant un diagnostic précoce et une interruption plus précoce également si nécessaire ayant moins de répercussion psychologique sur le couple.
- La possibilité d'un caryotype direct.
- La possibilité d'obtenir des spécimens de bonne qualité permettant des analyses enzymatiques ou une extraction de l'ADN.

Inconvénients :

-Les problèmes d'interprétation chromosomique : ils sont rares. Une observation des cellules en métaphase sans culture tissulaire permet de fournir un examen direct en 48 heures et la culture permettra en 10 à 15 jours de lire le caryotype à partir du noyau mésenchymateux, reflet plus fidèle des cellules fœtales. Les résultats ambigus de la technique [168] : faux positifs homogènes ou mosaïques sont principalement dus aux résultats de l'examen direct des cellules cytotrophoblastiques dans les 48 heures suivant le prélèvement. Leur taux brut est d'environ 1% ; cependant en combinant une analyse critique des faux positifs aux résultats des cultures (1 à 2 semaines), ce taux d'incertitude peut être réduit à 1/500 ou 1/1000. Ils nécessiteront un prélèvement d'une autre nature (amniocentèse ou cordocentèse) pour l'établissement du caryotype fœtal.

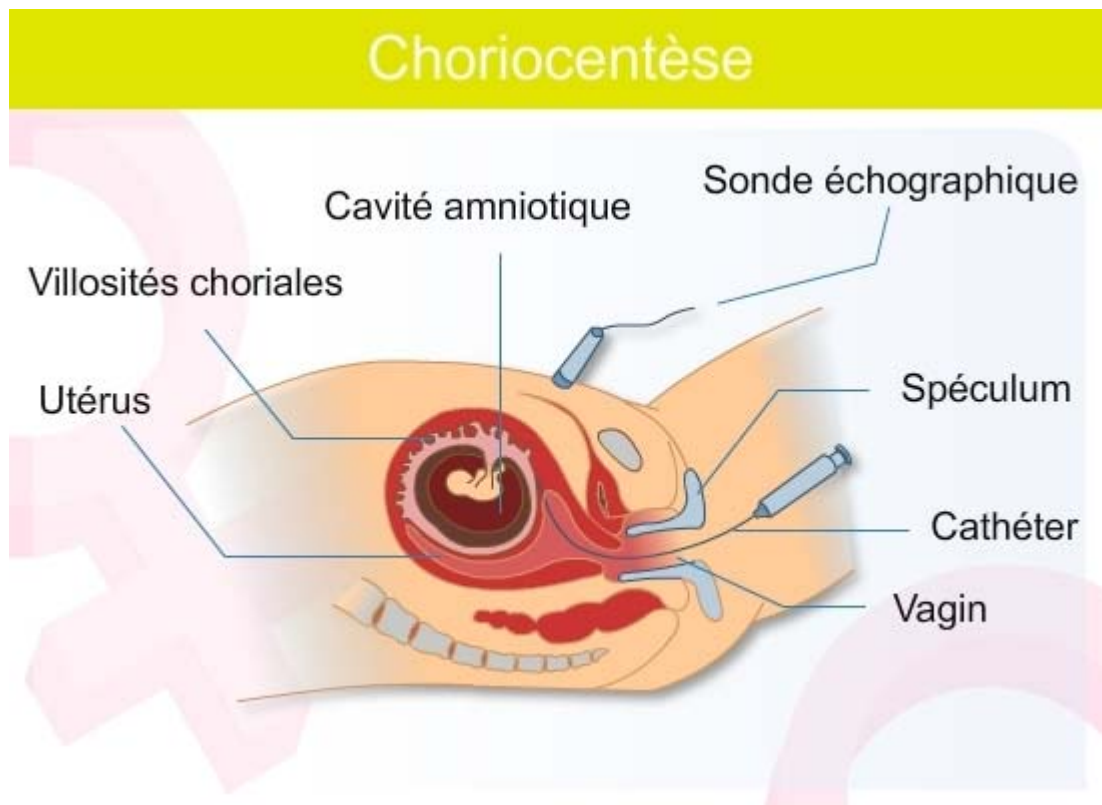


Figure 5 : Chriocentèse

CORDOCENTESE

Définition

La cordocentèse ou prélèvement de sang fœtal (PSF) est une technique invasive de DPN qui consiste à prélever, à partir du cordon ombilical, du sang fœtal pour des fins diagnostiques, thérapeutiques et pronostiques.

Historique

Voilà plus de 20 ans que l'accès à la circulation périphérique fœtale est possible. Valenti fut le premier en 1973 [169] à obtenir du sang fœtal par technique foetoscopique. Il rapporta son premier succès en ponctionnant un cordon ombilical à proximité de son insertion à l'abdomen fœtal. La technique utilisait un cystoscope pédiatrique. Ces premières ponctions étaient effectuées sur des fœtus pré abortifs.

A leur tour, Hobbins [170] en 1974, puis Henrion et Dumez [171] apportèrent des modifications à la technique. Un système de canulation permit un PSF pur sur des grossesses évolutives, sous contrôle endoscopique. Le but était de faire le diagnostic d'hémoglobinopathies. Le geste consistait en la ponction de vaisseaux de la plaque chorale : placentocentèse.

Cependant le faible diamètre des vaisseaux, ainsi que la contamination fréquente par du sang maternel ou par du liquide amniotique en rendirent les indications réduites.

Un affinement technique fut apporté en 1978 par Rodeck et Campbell [172].

L'extrémité cordonnale à l'insertion placentaire offre un site de ponction fixe, avec des vaisseaux de calibres supérieurs aux vaisseaux chorioniques. Cette nouvelle approche donnait l'avantage d'une contamination moindre par du sang maternel ou par du LA.

Toutefois la lourdeur du geste pouvant nécessiter une anesthésie générale, ses limites (transparence de LA, terme de la grossesse, répétition du geste impossible), et les risques abortifs conséquents (environ 4%) ont fait rechercher une méthode plus simple et reproductible de PSF.

L'avancée des techniques ultrasoniques dans la résolution des images permit bientôt à des esprits pionniers d'accéder aux vaisseaux ombilicaux par guidage échographique.

Daffos fut en 1983 [173] le premier à obtenir du sang fœtal pur par ponction percutanée du cordon ombilical, sous guidage échographique. Plus simple, s'effectuant en ambulatoire, sous anesthésie, avec un risque abortif diminué puis pronostique et thérapeutique permettant d'envisager le sauvetage du fœtus jusque là condamnés.

Matériel

- Badigeon bétadiné et Champs stériles
- Housse de protection stérile pour sonde d'échographie avec gel de contact stérile
- 2ml de citrate de sodium à 3.8 % utilisé pour éviter une coagulation dans l'aiguille de prélèvement
- 20ml de xylocaïne à 1% non adrénalinée
- Seringue à usage unique : 20ml pour l'anesthésie locale avec aiguille IM, 5 ml pour "citrater" l'aiguille et plusieurs seringues de 2 ou 5 ml pour prélever le sang fœtal.
- Tubes pour prélèvements sanguins pédiatriques

- Système de 2 aiguilles : une première aiguille guide pour la ponction utérine de 19G et une seconde pour la ponction funiculaire de 22G
- Ou bien une aiguille unique de 20G.

Terme

Le terme doit être connu avec précision, déterminé par une échographie précoce, le prélèvement peut être réalisé à partir de 18 jusqu'au terme de la grossesse, rarement à des termes plus précoces. Après 24 SA, en fonction du contexte clinique et du degré d'urgence on peut réaliser au préalable une maturation pulmonaire fœtale.

Techniques [174]

- L'utilisation d'agent tocolytique est envisageable durant le geste, il doit être discuté au cas par cas. Il est fonction du terme, du contexte clinique (contractions utérines) et de l'habitude des équipes.
- L'échographie s'assure de la bonne position du fœtus, d'une bonne vitalité. Le geste sera réalisé sous contrôle échographique permanent du site de ponction, mais aussi, du rythme cardiaque fœtal par intermittence.
- Une sédation maternelle est proposée par certains type Diazepam 10mg ou Temesta 1 mg une heure avant le geste.
- Une antibioprophylaxie par Kéfandol par voie intraveineuse est débutée 30 minutes avant le geste en dehors d'une allergie aux pénicillines.

5-1- Prélèvement au niveau du cordon ombilical (figure 6)

C'est le site privilégié et de très loin le plus utilisé :

- a-L'habillage est chirurgical avec port d'un masque, d'un bonnet, de sur chaussures, d'une casaque et de gants stériles.
- b-Préparation cutanée avec antisepsie chirurgicale en 5 temps selon le protocole du CLIN.
- c-Mise en place de champs stériles.
- d-Le repérage du cordon : c'est un temps primordial. Il est préférable de ponctionner le cordon à l'endroit où il est le moins mobile, c'est à dire son insertion placentaire.
- e-Son accès est possible dans près de 95% des cas. Il est rendu plus difficile par l'oligoamnios, un placenta postérieur ou le terme avancé de la grossesse, sauf bien sûr en

cas d'oligo-anamnios où le cordon peut être ponctionné dans n'importe quelle partie où il est accessible, compte tenu du fait qu'il est coincé entre le fœtus et la paroi utérine et qu'il ne peut fuir devant l'aiguille. D'autres sites sont également possibles : le cordon à l'insertion ombilicale, la veine ombilicale au niveau abdominale ou intra hépatique voire en intra cardiaque dans des situations extrêmes mais la morbidité de ce dernier type de ponction est élevée.

f- Le bilan échographique permet de repérer l'insertion du cordon ombilical sur le placenta. Le cordon repéré, la sonde est maintenue complètement immobile pour suivre la progression de l'aiguille dans le bon plan et selon la bonne inclinaison.

Deux grandes situations peuvent se présenter :

-l'insertion du cordon est antérieure : dans les conditions optimales, l'aiguille est introduite par voie transplacentaire et ponctionne le cordon à son origine sans pénétrer dans la cavité amniotique.

-l'insertion est latérale ou postérieure : l'aiguille aborde alors le cordon à 1 cm de son origine en passant à travers la cavité amniotique et, en cas d'insertion latérale, en général à travers le placenta également.

g-Ce choix n'est qu'indicatif et peut varier avec la localisation de l'insertion funiculaire sur le placenta, la position fœtale...

h-Anesthésie locale par xylocaine 1% non adrénalinée

i-Ponction dans le plan de l'image sous contrôle échographique permanent, le choix du vaisseau est difficile avant 28 SA. En raison de son volume, c'est le plus souvent la veine qui est ponctionnée. On aborde tout d'abord de cordon, puis on le pénètre d'un coup franc sans le transfixier, en l'absence de reflux sanguin, on retire très légèrement et progressivement l'aiguille en prenant soin de ne pas en sortir sous peine de majorer les pertes sanguines fœtales par hémorragie dans le LA.

j-On retire le guide, le 1er ml est jeté (surtout si on désire une numération plaquettaire, une étude de l'hémostase ou une recherche IgM spécifique, cela n'est pas indispensable en cas de caryotype) puis on procède au prélèvement.

k-Après le retrait de l'aiguille, on recherche un saignement sur le point de ponction au niveau du cordon mais aussi du placenta si on a franchi l'interface placenta-LA, sa durée est

notée dans le compte rendu. On étudie aussi le RCF par échographie tant que dure ce saignement, puis si tout est normal, la patiente peut sortir de la salle de prélèvement avec réalisation d'un monitoring pendant 1 heure.

5-2- Prélèvement au niveau de la veine ombilicale dans son trajet intra abdominal foetal

Ce site de prélèvement, très accessible lorsque le fœtus se présente ventre en avant, est fréquemment utilisé par les opérateurs lorsque le cordon ombilical n'est pas visible ou pas accessible [175].

Il a l'avantage d'exclure les risques de contamination par du sang maternel. En outre, le risque hémorragique à partir du point de ponction est théoriquement peu dangereux, dans la mesure où la perte sanguine répartie en intra péritonéal foetal est réabsorbée par le fœtus comme lors de transfusions intra péritonéales. Ses inconvénients sont l'impossibilité d'accès à ce site lorsque le fœtus se présente dos en avant, et le risque théorique plus important de déchirure de la paroi de la veine ombilicale, très mince dans sa portion abdominale, par opposition à sa paroi dans le cordon.

Limites

Avant 18 SA, la taille des vaisseaux ombilicaux, < 3 mm, rend le prélèvement difficile [176].

Certains auteurs ont publié des courtes séries de prélèvements à des termes plus précoces, dès 12–13 SA, pour DPN de thalassémie essentiellement.

Une série plus importante fait état de 1 320 PSF entre 16 et 24 SA, majoritairement après 18 SA. Ces auteurs ont tous noté un risque qui diminue très nettement après 18 SA [176].

L'obésité maternelle, la présence d'un anamnios, une très mauvaise image échographique peuvent compliquer, voire interdire, le succès d'un prélèvement. Mais ces situations sont rares et peuvent, dans la plupart des cas, être surmontées par l'utilisation d'aiguilles plus longues, par le remplissage préalable de la cavité amniotique (pour obtenir une image de meilleure qualité), ou par le report du prélèvement à un terme de grossesse plus avancé (afin que les vaisseaux ombilicaux soient mieux visibles) [176].

Le volume du sang prélevé est très limité et ne doit pas dépasser 0,5 ml avant 16 SA et 3 ml à 18 SA. Il est donc nécessaire que le diagnostic biologique utilise des techniques miniaturisées à l'extrême pour permettre de réaliser toutes les analyses nécessaires.

Le contrôle de la pureté est une étape préalable indispensable à la réalisation de tous les diagnostics prénatals. En effet, la moindre trace de contamination par du sang maternel ou du liquide amniotique risquerait d'induire un faux résultat.

Préalable à l'analyse de tout résultat: le contrôle de la pureté du sang fœtal

Tout prélèvement peut être contaminé soit par le sang maternel soit par le LA.

L'examen direct du prélèvement peut déjà révéler une dilution par le LA en fonction de sa couleur.

La pureté peut être contrôlée par :

- agglutination anti i/anti I
- dosage β HCG
- dosage α FP
- indices hématologiques et courbes de distribution
- hémostase fœtale
- Kleihauer et focusing d'hémoglobine
- Examens biochimiques

Ces tests sont soit extemporanés, soit différés.

Il est impératif de connaître le passage transplacentaire des différentes molécules dosées (certaines sont en équilibre entre la mère et le fœtus : urée, créatinine, parfois le passage s'effectue par mécanisme actif comme les IgG; d'autres ne passent pas du tout : γ GT, LDH, IgM...).

Une contamination par exemple au 1/1000e par du sang maternel peut, dans un contexte infectieux, faire croire à la présence d'IgM spécifiques dans le sang fœtal et donc faire penser à tort à une contamination maternofoetale. Les conséquences pour la pratique peuvent être désastreuses.

Par ailleurs, une contamination par le LA, en activant la coagulation fœtale, peut être responsable d'une fausse thrombopénie et de facteurs de la coagulation effondrés.

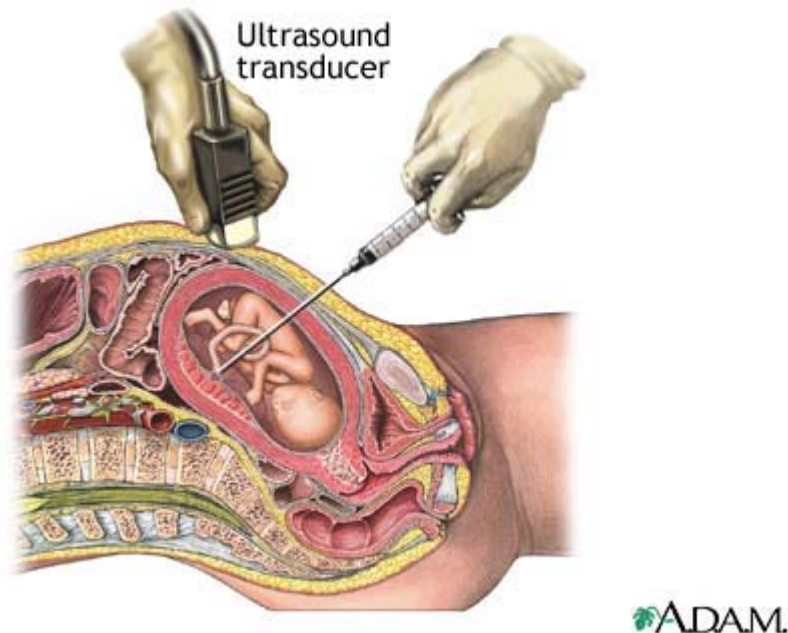


Figure 6 : Cordocentèse

PRELEVEMENTS RARES

Urine fœtale

Il est possible de prélever de l'urine fœtale pour évaluer la fonction du rein chez un fœtus atteint d'une obstruction urinaire (valve de l'urètre postérieur par exemple) [177].

Epanchements des séreuses

Un épanchement pleural, une ascite peuvent également être ponctionnés, leur analyse biochimique ou cytologique pouvant contribuer à déterminer leur cause.

Le risque lié à ces examens est probablement similaire à celui d'un PSF.

Peau fœtale

La peau fœtale peut être prélevée à partir de 22 SA [178] pour le DPN de certaines génodermatoses très graves (épidermolyses bulleuses, fœtus arlequin par exemple).

Ces prélèvements qui ne sont envisagés que dans un contexte d'antécédent familial avec risque de récurrence élevé, ne sont réalisés que par un petit nombre d'équipes dans le monde.

Des prélèvements de muscle, de foie, de rein fœtal sont également possibles, mais d'indication encore plus exceptionnelle [179]. Leur risque est difficile à préciser.

Tableau 6 : calendrier des prélèvements foetaux

Calendrier	10ème SA	14ème SA	20ème SA jusqu'à 40 SA
Types de prélèvement	Villosités choriales (trophoblastes)	Liquide amniotique	Sang fœtal
Risques liés au prélèvement	2-5 % FCS	0,5 %	3 %
Techniques utilisées	- Examen direct (24h) - Culture (2-3 semaines)	Cultures	
Délais		15 jours	4 jours
Qualités	Médiocre	+++	++++
Fiabilités	+ ou -	+++	++++

COMPLICATIONS

I- AMNIOCENTESE

Les complications maternelles :

1-1 complications traumatiques :

Des blessures vasculaires sous cutanées sont possibles aboutissant à la constitution d'ecchymoses pariétales sans gravité.

Les vaisseaux épigastriques inférieurs sont rarement touchés si l'on prend la précaution de rester haut et médian sur l'utérus. Les piqûres digestives sont exceptionnelles si l'on prend soin d'éviter toute interposition par une pression suffisante sur la sonde.

1-2 Hydrorrhée

La survenue d'un écoulement dans les heures qui suivent la ponction est une éventualité rencontrée dans environ 2% des cas quel que soit le terme du prélèvement. Elle nécessite l'hospitalisation de la patiente et souvent une antibiothérapie dans un 1^{er} temps par voie intraveineuse. La surveillance échographique recherche la survenue d'un anamnios dont le pronostic est péjoratif d'autant plus que le terme est précoce. L'évolution se fait dans la majorité des cas vers un tarissement de l'écoulement et la reconstitution d'une quantité normale de LA. En cas d'anamnios prolongé une IMG peut être discutée.

Plusieurs facteurs ont été évoqués à l'origine de cette perte de LA après amniocentèse tels que :

-L'âge de la grossesse : Fréquence des pertes de LA lors d'amniocentèse précoce réalisés avant 15 SA (3,5%) VS 17 SA (1,7%).

-La localisation placentaire : Perte de LA dans le groupe de patientes chez qui l'insertion de l'aiguille avait été effectué à distance du placenta mais ceci a été contredit par les études de Johnson.

L'adhérence plus importante des membranes au niveau du placenta a été le plus souvent avancée pour expliquer ces constatations.

D'autres facteurs ont été évoqués : l'expérience de l'opérateur, le diamètre de l'aiguille, la technique de prélèvement...

1-3 Iso-immunisation rhésus

Le risque est plus grand en cas de ponction transplacentaire de liquide amniotique (placenta antérieur) et en cas de LA sanglant. Le passage de globules rouges fœtaux dans la circulation maternelle serait plus précisément en rapport avec la perforation du placenta par l'aiguille. La prophylaxie par injection d'une ampoule de gammaglobulines anti-D (300 microgrammes) à toute patiente de Rhésus négatif est donc indispensable.

1-4 L'infection

L'infection amniotique reste un accident exceptionnel, estimé à moins de 0,1%. Il s'agit de chorioamniotites et de chocs septiques. Ils surviennent soit en cas de défaut d'asepsie cutanée, dans ce cas le germe retrouvé est souvent un staphylocoque ou en cas de ponction d'une anse grêle sur le trajet de l'aiguille, dans ce cas l'infection est polymicrobienne avec une prédominance d'escherichia coli et de germes anaérobies [180,181].

Fray a rapporté un cas gravissime d'avortement septique à clostridium Welchii, dans les 12 heures suivant la ponction amniotique, ayant conduit à la perte fœtale et à l'hystérectomie de la patiente [182]. A partir d'une série de 4000 cas, sur 10 ans de pratique, F.Perrotin [183] rapporte 3 accidents maternels graves (chorioamniotites) dont une avec septicémie maternelle et choc septique ayant entraîné le décès de la patiente.

La potentielle gravité de ces complications nous rappelle l'importance des mesures d'asepsie nécessaire à la réalisation de ce geste dans des conditions " chirurgicales".

Des données récentes indiquent que des infections minimes, au moment de l'intervention, accompagnées de taux de cytokines accrus dans LA sont responsables d'environ 10 à 50% des pertes fœtales se produisant après amniocentèse [180].

Les complications fœtales :

2-1 Fausse couche ou mort fœtale

L'évaluation du risque de PF liée à la réalisation d'un geste invasif n'est pas aussi simple qu'elle le paraît, et ceci pour plusieurs raisons.

–La relation de cause à effet entre le geste et la perte fœtale n'est pas toujours facile à établir. Il faut en particulier considérer avec prudence les études fondées sur un suivi court,

et qui concluent par exemple à l'absence de complications imputables à un examen si aucun accident n'est survenu dans un délai arbitraire d'une à deux semaines après le geste.

–Des PF peuvent survenir en l'absence de geste invasif, et ce risque n'est pas toujours quantifiable avec précision. L'ordre de grandeur de ce risque naturel, indépendant de l'amniocentèse (fausse couche tardive et mort in utero) peut être estimé aux environs de 3% [184]. De plus, ce risque augmente avec l'âge maternel [185]. La pathologie ayant motivé la réalisation d'un geste invasif (anomalie échographique, MSM) peut constituer en soi un facteur de risque de fausse couche.

Globalement, le taux de PF après amniocentèse semble se situer aux alentours de 1 à 1,5% au-delà du taux normal de fausses couches [186]. Ce risque est dépendant du terme auquel est effectué l'amniocentèse.

Avant 15 SA, le risque est évalué à environ 2.2 % de fausses couches mais il est important de rapprocher ce chiffre au taux de PF " naturelle " qui est de l'ordre de 2% avant 18 SA [186].

Après 15 SA le risque de PF imputable à l'examen (en plus du risque naturel de fausse couche) peut être estimé aux alentours de 0,5% à 1% d'après les études publiées.

Une étude prospective randomisée multicentrique récente réalisée au Canada retrouve une différence significative dans le taux de PF, par ailleurs élevé, entre amniocentèse précoce et celle réalisée après 17 SA (5.9% VS 7.6%) [125]. Pour d'autres auteurs, une différence ne semble apparaître que lorsque l'amniocentèse est réalisée avant 12 SA [187].

Dans l'étude du Medical Research Council [188], l'excès de PF après amniocentèse réalisée au 2^{ème} trimestre était probablement surestimé (1,5%) du fait d'une sous estimation du nombre de fausses couches spontanées chez les témoins (âge gestationnel élevé de certains témoins lors de l'inclusion dans l'étude) et du nombre d'amniocentèses réalisées pour cause d'élévation de l' α FP maternelle, qui est en soi un facteur de risque de fausse couche. D'autres études cas témoins montrent qu'un risque de PF supplémentaire induit par l'amniocentèse est <1% .

L'étude randomisée de Tabor et al [189] montre une augmentation significative du risque de PF après amniocentèse (1,7 %) comparé à une population témoin appariée n'ayant eu qu'une échographie (0,7 %). Cette étude est cependant déjà relativement ancienne, et il est possible

que l'amélioration des techniques d'échoguidage aient pu contribuer à diminuer le risque de fausse iatrogène à moins de 1%, dans les mains d'opérateurs entraînés. Au contraire, le risque de complication est plus élevé pour un opérateur inexpérimenté.

Le risque de PF est majoré par :

- l'absence d'échoguidage
- les ponctions avec plus de 3 insertions de l'aiguille
- l'expérience plus faible de l'opérateur [5].
- des antécédents de fausse couche à répétition chez la patiente
- l'âge > 35 ans
- pour certains auteurs une ponction transplacentaire ou un LA sanglant, mais des études récentes contredisent cette notion [5]

Les principaux facteurs de risque de PF après amniocentèse sont :

- un âge maternel de plus de 35 ans
- les antécédents d'avortement à répétition
- les ponctions itératives (plus de deux insertions)
- l'inexpérience de l'opérateur

Au 3^{ème} trimestre, le taux de PF est très faible (1/1000) [190] compte tenu du franchissement du seuil de viabilité et de la réalisation fréquente d'une maturation pulmonaire fœtale en préparation du geste. C'est pourquoi elle est parfois réalisée, comme compromis dans le rapport bénéfice-risque, dans le cas de situations " limites " en terme de risques chromosomiques et de demande des parents.

2-2 Les lésions fœtales

Elles sont exceptionnelles depuis l'échoguidage systématique avec des appareils de bonne qualité, il est décrit dans la littérature :

- Des blessures cutanées fœtales : Elles ont été rapportées dans la littérature avant l'avènement de l'échoguidage. Ces lésions, constatées lors de l'examen du nouveau-né à la naissance, se présentent sous forme de petites marques cutanées, le plus souvent

déprimées, de 1 à 2mm de diamètre, et probablement liées à une légère effraction par l'aiguille de ponction.

Ce risque de blessure fœtale est de l'ordre de 1 à 2%. Il augmente avec le nombre de ponctions par séance et diminue avec l'expérience de l'opérateur et l'utilisation de l'échoguidage.

-Des cas plus graves mais exceptionnels ont été décrits : traumatisme oculaire [190], rupture d'un tendon d'Achille [191], gangrène d'un membre après blessure artérielle [192], ponction cardiaque [193].

-Il n'est pas retrouvé de malformation fœtale avec une plus grande fréquence parmi les patientes ayant bénéficié d'une amniocentèse. Toutefois, deux études récentes ont rapporté une fréquence accrue de malformations orthopédiques (luxation de hanche, pieds bots (1,2% à 1,3%), malposition des pieds) et troubles respiratoires (détresse respiratoire néonatale, hypoplasie pulmonaire) chez des enfants nés après amniocentèse précoce comparés à un groupe contrôle [125] [194]. Cependant dans une de ces études, l'amniocentèse comportait un prélèvement de 25ml de LA : il semble que ces complications soient attribuables à la déplétion en LA. La survenue de ces malformations serait en effet plus fréquente en cas de prélèvement avant 13SA ou d'hydrorrhée avec oligoamnios, c'est pourquoi l'amniocentèse précoce commence à être abandonnée au profit de gestes plus tardifs et plus sûrs.

-Concernant le taux de prématurité post amniocentèse, il n'a pas été démontré d'augmentation de sa fréquence.

-Des lésions du cordon avec exsanguination fœtale

-Des grossesses extra membraneuses [195].

-Des brides amniotiques.

-Des strictions du cordon [196].

-Il semble enfin que le devenir des enfants après la naissance soit comparable à celui des enfants n'ayant pas subi de prélèvement [196].

Comparaison Amniocentèse du 1^{er} et du 2^{ème} trimestre :

Les résultats de l'essai canadien à grande échelle, multicentrique, prospectif et randomisé [125 ,197] qui a comparé l'amniocentèse précoce (de la 11^{ème} à la 12^{ème} semaine et 6

jours) et l'amniocentèse du 2^{ème} trimestre (de la 15^{ème} à la 16^{ème} semaine et 6 jours) ont confirmé les conclusions d'autres essais randomisés. On a constaté des différences importantes entre amniocentèse précoce et celle pratiquée au 2^{ème} trimestre, pour les issues suivantes :

- nombre total de PF, avant et après l'intervention, les mort-nés et les décès néonataux : 7,6 % pour l'amniocentèse précoce contre 5,95 % pour l'amniocentèse du deuxième trimestre, $P = 0,012$,

- les pieds bots à la naissance : incidence de 1,3 % dans le groupe précoce, comparé à 0,1 pour le groupe du 2^{ème} trimestre, $P = 0,0001$ et la perte de LA : 3,7 % pour le groupe précoce, comparé à 1,5 % au 2^{ème} trimestre, $P = 0,0007$.

- L'amniocentèse précoce était en outre associée à un risque augmenté de rupture prématurée des membranes (1,3% au lieu de 0,1%), source potentielle de morbidité pédiatrique.

Les échecs des cultures cytogénétiques étaient plus élevés dans le groupe de l'amniocentèse précoce : 1,8 % pour l'amniocentèse précoce contre 0,2 % pour l'amniocentèse au 2^{ème} trimestre, $P < 0,0001$, ce qui a obligé d'avoir recours à d'autres techniques de DPN pour ces femmes si un diagnostic supplémentaire s'avérait nécessaire. Dans les deux groupes, il n'y a pas eu de différences importantes dans l'incidence des maladies respiratoires néonatales ou des luxations congénitales de la hanche.

Depuis 2003, une méta analyse de la " Cochrane database " [215] a inclus un total de 14 études randomisées:

- Dans une population à bas risque de perte fœtale, estimée à environ 2%, une amniocentèse du 2^{ème} trimestre augmentera ce risque d'encore 1%.

- L'augmentation des pertes spontanées suivant l'amniocentèse du 2^{ème} trimestre comparée aux groupes témoins (aucune amniocentèse) est statistiquement significatif : 2.1% contre 1.3% ; risque relatif (RR) 1.02 à 2.52.

- L'amniocentèse précoce n'est pas une alternative de choix à l'amniocentèse du 2^{ème} trimestre en raison du taux de pertes fœtales accru (7.6% contre 5.9% ; RR de 1.29, IC de 95% : 1.03 à 1.61) et une incidence plus élevée des pieds-bots comparée au PVC (1.8% contre 0.2% ; RR de 6.43, IC 95% de 1.68 à 24.64).

II– CHORIOCENTESE

Les complications maternelles :

- Les métrorragies : Elles correspondent le plus souvent à un hématome sous chorial qui s'évacue. Cet hématome serait présent dans environ 4% des cas [198]. Elles sont plus fréquentes au cours des prélèvements par voie cervicale (25% des cas). Elles durent en général 3 à 4 jours et ne mettent pas en jeu le pronostic de la grossesse bien que leur surinfection, heureusement rare, est souvent d'évolution redoutable.
- La rupture prématurée des membranes : Elle est rare après un PVC puisque dans la majorité des cas, il n'y a pas d'effraction de la poche des eaux (fréquence estimée à environ 0,3% des cas) [199]
- Allo immunisation rhésus : Cette complication ne devrait plus se voir puisque la prévention doit être systématique par une injection intraveineuse de 300µg de gammaglobuline anti-D chez les femmes rhésus négatif [200]. Par ailleurs, le PVC est déconseillé chez les patientes antérieurement immunisées et chez lesquelles on craint une nouvelle stimulation [200].
- Un hématome au point de ponction: très rare
- Une fuite de LA : rare, de 0,3 à 0,7%
- Une hémorragie foeto maternelle avec risque d'iso-immunisation rhésus.

Ces complications sont de l'ordre de 2% avant 12 SA et 2,5% après, dans l'étude de Saura

- Les infections : Les chorioamniotites (0,3%) ou les chocs septiques sont rares, ils surviennent plus souvent lorsque le prélèvement a été effectué par voie transcervicale [199]. Elles se déclarent en général 2 à 5 jours après le geste.

Les auteurs insistent en cas de biopsie transcervicale sur la désinfection soigneuse du vagin par des produits bactéricides, du report ou de l'annulation en cas d'infection vaginale, de cervicite, de grossesse sur stérilet; de changer le matériel de prélèvement à chaque insertion transcervicale chez une même patiente et de limiter le nombre d'insertion.

Les complications foetales

2-1 Les fausses couches

Dès les premiers PVC vers 1982, la question des risques liés à cet examen a fait l'objet de nombreuses investigations.

En effet, la préoccupation des cliniciens était de s'assurer que la précocité du diagnostic au premier trimestre n'était pas contrebalancée par un nombre de fausses couches supérieur à celui observé après amniocentèse. A cette époque, plusieurs faits ont contribué à une surévaluation initiale du risque du prélèvement de trophoblaste. D'une part, les premières études comportaient des accidents liés à l'apprentissage d'une nouvelle technique; d'autre part, l'examen étant réalisé tôt dans la gestation, des fausses couches naturelles lui étaient imputées à tort.

Finalement, tous les essais randomisés faits à l'époque concluaient à un excès de fausse couche quand le prélèvement est fait avant 12 SA [200]. Le choix de la technique (transcervical ou transabdominal) n'explique pas totalement ces différences. En effet Jackson [201] ne retrouve pas de différence significative en comparant les deux techniques de choriocentèse: 2,5 % par voie transcervicale contre 2,3 % par voie transabdominale. Seul Smith Jensen obtient un taux de perte fœtale ainsi que d'échec de ponction après PVC transcervicale significativement plus élevé qu'après PVC transabdominale [202].

Il semblerait aussi que l'expérience de l'opérateur soit un paramètre important dans l'évaluation des pertes fœtales.

Comme le risque de perte de grossesse augmente aussi avec le nombre de tentatives nécessaires pour obtenir le tissu chorial, on ne devrait pas faire plus de deux tentatives. Les facteurs de risque liés à l'intervention peuvent aussi être affectés par la position de l'utérus et du placenta selon la technique de PVC utilisée. Les fibromes utérins peuvent affecter les chances de succès de la technique et faire augmenter le risque de perte de grossesse.

Les autres facteurs de risque sont les métrorragies en début de grossesse, le nombre de tentatives de prélèvement, les antécédents obstétricaux, l'âge maternel et les ponctions transamniotiques.

En conclusion : le risque d'avortement varie entre 2 et 5.5%.

Ce risque dépend :

- de l'âge maternel : 1.9% à 35 ans, 10.9% à 40 ans [203]
- du terme : il augmente avant 10 SA [204]

–de l'expérience de l'opérateur

–du nombre d'insertions : 3% en cas d'une seule insertion, augmentation à 12% si 3 ou plus [200].

Ce risque est majoré en cas de saignement en début de grossesse, d'antécédent de fausse couche, d'une ponction transamniotique.

2-2 Les anomalies fœtales

Depuis la publication de Firth en 1991 [205], plusieurs auteurs ont rapporté des amputations transversales distales des membres consécutivement à des PVC [206,207]. Ces malformations pourraient être la conséquence de lésions tissulaires hypoxiques créées par des lésions vasculaires au niveau du trophoblaste, lors d'un prélèvement précoce trop important, ou trop prolongé. Par ailleurs, la libération de produit vaso-actif pourrait entraîner une vasoconstriction périphérique avec hypoxie et nécrose secondaire.

Firth a rapporté l'observation de 5 enfants [205], nés de mères ayant subi un PVC entre 9 et 10 SA et qui présentaient des anomalies de membre associées, chez 4 d'entre eux, il s'agissait d'anomalies de la bouche et des mandibules.

Toutes les anomalies portant sur les extrémités et la face après PVC étaient décrites à la suite de prélèvements réalisés avant 10 SA. Brambati et son équipe [198] retrouvent une fréquence relativement importante (1,6%) d'anomalies sévères des membres chez les fœtus lorsque le prélèvement était réalisé avant 8 SA. Ces anomalies n'ont pas été retrouvées dans d'autres études où le prélèvement était réalisé après 11 SA.

Dans l'ensemble de la population, on estime l'incidence de membre transverse (mineure ou majeure) à 9/10 000 naissances vivantes [198]. 1/3 de ces anomalies pourrait être dû à une séquence de perturbations vasculaires, telle que le PVC. Le risque de malformation d'un membre ou du visage, associé au PVC, pourrait s'élever à 1/3000 [208]. Récemment, le registre national colligé par Froster et Jackson portant sur une série de 140 000 PVC conclut à l'absence de différence significative sur les lésions distales des membres entre le groupe PVC et la population générale [208]. Pour Firth en 1997 [150], il faut retenir de ces différentes études la contre indication absolue à réaliser un PVC avant 10 SA, la période idéale en terme de risque malformatif fœtal se situant après 11 SA.

Quoi qu'il en soit, et même si l'incidence de ces malformations n'est pas augmentée après le PVC après 11 SA, il paraît prudent de réserver cet examen aux situations où le risque de découvrir une anomalie est élevée, et où le bénéfice potentiel d'un diagnostic précoce est donc grand.

2-3 Les complications périnatales

Définies comme survenant après 28 SA, le PVC ne modifie pas le risque de RCIU, de mort fœtale in utero, de mort néonatale, de prématurité.

LE CHOIX DES ARMES : LE CHOIX ENTRE AMNIOCENTESE ET CHORIOCENTESE :

Un essai randomisé effectué récemment avait pour objectif d'évaluer l'innocuité et la précision de l'amniocentèse et de la choriocentèse lorsque pratiqués entre la 11^{ème} et la 14^{ème} semaine de gestation [209]. La mesure de l'issue primaire d'une PF suivant un accouchement préterme avant la 28^{ème} semaine de gestation dans le cas de fœtus normaux sur le plan cytogénétique était semblable dans les deux groupes (2,1 % pour le PVC par rapport à 2,3 % pour l'amniocentèse). Les pertes spontanées de grossesse avant la 20^{ème} semaine et les interruptions de grossesse liées à l'intervention semblaient à la hausse dans le groupe amniocentèse (Risque relatif : 1,74, intervalle de confiance à 95 %, 0,94–3,22 $P = 0,07$). On a également constaté un taux 4,65 fois plus élevé de pied bot varus équin suivant une amniocentèse précoce (intervalle de confiance à 95%, 1,01–21,5, $P = 0,017$).

Cette étude a conclu que l'amniocentèse pratiquée à 13 semaines de gestation présente un risque considérablement accru de pied bot varus équin par rapport au PVC, ainsi qu'un risque potentiellement accru de perte de grossesse précoce inattendue.

Nicolaides en 1996 publie une étude prospective randomisée portant sur 1492 femmes, l'amniocentèse avant 15 SA et la choriocentèse : Les deux techniques sont comparables dans le taux de succès et le résultat cytogénétique. Par contre le taux de perte fœtale spontanée de 4,9% pour le groupe amniocentèse avant 15 SA fut significativement plus élevé qu'après choriocentèse transabdominale (2,1 %).

Cette étude est homogène et le groupe d'opérateurs est très entraîné dans les 2 techniques. Le taux de PF après choriocentèse (2,1%) est plus bas que dans l'étude canadienne (5,4%), l'étude européenne (6,3%) ou danoise (7,9 % en transcervicale ; et 3% en transabdominale). Il a été conclu alors que dans un centre de médecine fœtale la choriocentèse transabdominale a un risque identique à l'amniocentèse précoce faite vers 12 ou 13 SA [210,211].

Seuls les prélèvements transcervicaux paraissent quasi-unaniment reconnus comme porteurs d'un plus grand risque de PF et un plus grand risque de contamination par des cellules maternelles. En effet le risque relatif de PF est avec cette technique 1,7 fois plus élevé qu'avec une approche transabdominale ou une amniocentèse [212,213]. Dans 2 grandes séries dont une randomisée, le PVC transabdominal n'est pas apparu comme associé à un risque de PF plus importantes que l'amniocentèse au 2^{ème} trimestre [214]. L'augmentation décrite d'anomalie transversale des extrémités et de la face après PVC semble particulièrement confiné aux gestes effectués avant 10 SA et depuis, les PVC sont réalisées à partir de 11 SA.

De toutes ces études, il ressort un guide de choix entre les techniques proposées pour risque cytogénétique: choriocentèse, amniocentèse précoce ou classique :

- Si la fréquence du risque de l'affection recherchée est $< 1\%$, l'amniocentèse à 13, 14 SA est en concurrence avec la choriocentèse : le choix doit être donné à la patiente.
- Si le risque est supérieur à 1%, nous restons fidèle à la choriocentèse : transcervicale à 12 SA, transabdominale au delà de 13 SA
- Enfin en cas de grossesse gémellaire (ou multiple), l'amniocentèse est préférable vers 14 SA par la technique à une seule entrée.

Ces difficultés quant aux choix de l'outil diagnostique invasif précoce arrivent alors que le dépistage des anomalies chromosomiques est de mieux en mieux réalisé lors de l'échographie de 10-14 SA comprenant en outre la mesure de la CN fœtale. Ce test de dépistage permet de dépister environ 80% des anomalies chromosomiques fœtales. Il bénéficie d'une diffusion de plus en plus large et d'une réalisation de plus en plus précise : il

impose donc de disposer d'un test diagnostique tout aussi précoce et fiable au prix d'un risque acceptable : le PVC semble correctement remplir ce cahier des charges.

IV. CORDOCENTESE

Complications :

Leur fréquence est extrêmement variable et dépend clairement de l'expérience des opérateurs. Comme pour n'importe quel acte technique délicat, il existe une période d'apprentissage, et les complications diminuent avec le nombre de prélèvements réalisés [216]. Les études collaboratives effectuées en Europe et aux États-Unis par des équipes ayant réalisé plus de 200 PSF font apparaître un risque de complications inhérent à la technique de 0,6 % à 1,5 % [217,218].

–Perte fœtale : Dans une série française, il a été retrouvé un taux global de fausses couches et morts in utero de 2,03 %. [216]. Ce risque est augmenté dans les situations où l'hémodynamique fœtale est instable, par exemple en cas de RCIU.

Avant 21 SA, les risques de mort fœtale après ponction de cordon sont d'autant plus élevés que le terme de la grossesse est précoce. Cette technique ne doit être mise en œuvre qu'après 20–22 SA [219].

–Infection ovulaire : Son risque, bien que très faible (1 cas sur 2 500 dans notre série), est toujours possible et il faut s'acharner à la prévenir par une routine et un rituel d'asepsie très stricts. Ce risque est très certainement corrélé au nombre d'insertions abdominales maternelles.

–Bradycardie fœtale : Dans la même série française, elle n'est apparue que dans 5,38 % de l'ensemble des prélèvements (9% pour Daffos [220], 52, 9.8% pour Duchatel [221]), et sa durée a été supérieure à 5 minutes dans seulement 0,9 % des cas [220]. Mais c'est dans ce groupe des bradycardies très prolongées que sont survenues la plupart des morts in utero. Leur étiologie est mal connue. Plus que des embolies amniotiques, certains cas de thrombose vasculaire ont été décrits, mais l'hypothèse la plus vraisemblable est la présence d'un spasme des vaisseaux ombilicaux (et en particulier des artères), bien visible à l'échographie et dont la prévention par l'atropine est discutée. Des troubles du rythme

survenus après PSF pratiqués en fin de grossesse conduisent souvent à la césarienne en urgence pour éviter la mort fœtale [222].

–Hémorragie fœtale : L'exsanguination foetale est toujours possible à partir du point de ponction funiculaire, mais sa fréquence semble très rare et limitée à des indications particulières de prélèvement. Il n'a été déploré dans la même série que deux cas d'hémorragie foetale mortelle : chez un fœtus atteint de thrombasthénie de Glanzmann homozygote, et chez un autre présentant une thrombopénie extrême à 5 000 plaquettes dans un contexte d'allo immunisation antiplaquettaire [220].

–Ruptures prématurées des membranes, accouchements prématurés et RCIU : Ils ne semblent être significativement augmentés dans aucune des séries publiées. Il a même été retrouvé un taux d'accouchements prématurés inférieur à celui de la population générale, probablement en raison du fait que ces patientes sont globalement plus et mieux suivies.

–L'échec de ponction (<5%).

–L'accouchement prématuré ou la menace (contractions utérines avec modification cervicale nécessitant une tocolyse) (<5%).

–L'hématome du cordon (1.5%) semble surtout survenir si la ponction est faite dans une portion libre du cordon. Son association a été décrite avec des MFIU, elle doit faire discuter une extraction fœtale ou une surveillance extrêmement serrée.

–La thrombose des vaisseaux du cordon : elle est très rare, ce risque existe essentiellement en cas de prélèvements itératifs comme lors de transfusion in utero avec l'injection de sang à très forte hématokrite.

–La mort fœtale in utero : c'est la complication la plus grave ; le risque global varie de 1% [52] à 1,9% [223], et même 5,87% [54]; le taux moyen, à partir d'une série importante (4922 cas) regroupant plusieurs études de la littérature, est de 3,84% [54]. Cependant le taux de mortalité in utero directement imputable au prélèvement est notablement plus faible, semblant pouvoir être estimé à moins de 1% : 0,8% [52-54]; 0,98% selon Duchatel [221]. Ce risque varie en fonction de l'état fœtal [224], plus faible en cas de fœtus sain (plus faible en cas de PSF pour rubéole par exemple), plus important en cas de fœtus fragilisé (PSF pour RCIU sévère) : respectivement 11,2% et 0,58% dans la série de Duchatel [221].

Cette dernière complication fait donc réserver ce type de prélèvement aux fœtus à haut risque d'anomalie chromosomique, ainsi qu'aux situations justifiant l'obtention du caryotype dans un délai court, et ce d'autant plus que le terme est avancé.

OUTILS D'ANALYSE DES PRELEVEMENTS

Le cytogénéticien dispose pour l'analyse des prélèvements fœtaux de la cytogénétique classique et de la biologie moléculaire.

Le choix de la méthode d'analyse dépendra du contexte clinique, échographique, du type de prélèvement et du délai souhaitable pour l'obtention des résultats.

Le caryotype est le premier examen permettant une analyse globale du génome. Depuis la fin des années 1980, les cytogénéticiens ont à leur disposition de nouvelles techniques alliant l'établissement du caryotype et des techniques de la biologie moléculaire. Ces techniques reposent essentiellement sur la FISH (fluorescent in situ hybridation). Mais de nombreux remaniements chromosomiques ne sont pas détectés par cette technique, c'est dans cette optique que la CGH, puis la CGH microarray ont été développées, constituant ainsi une véritable révolution dans la cytogénétique moléculaire.

I. LA CYTOGENETIQUE CLASSIQUE OU CONVENTIONNELLE

La cytogénétique classique repose sur l'établissement du caryotype fœtal. Le diagnostic prénatal cytogénétique part du principe que la constitution chromosomique d'un individu est déterminée à la conception et que les mitoses successives au cours de l'embryogenèse reproduisent invariablement le même caryotype dans tous les tissus. Ceci concerne aussi bien les tissus embryonnaires et fœtaux que les tissus extra embryonnaires (chorion, amnios).

C'est à partir de ce principe que se sont développées les méthodes de prélèvements fœtaux permettant d'établir le caryotype.

Le caryotype consiste à établir la carte chromosomique d'un individu afin d'explorer le nombre et la structure des chromosomes présents.

La formule chromosomique normale d'un homme est 46 XY et celle d'une femme est 46 XX.

Les chromosomes peuvent être observés dans toutes les cellules capables de se diviser.

Certains tissus ont un index mitotique élevé permettant une étude directe des chromosomes, c'est le cas des villosités chorales, mais grâce aux techniques de culture cellulaire, il est possible d'obtenir des cellules en division à partir de très nombreux tissus (lymphocytes ou cellules amniotiques).

Prélèvements [225] :

Trois tissus sont actuellement disponibles pour le DPN des anomalies chromosomiques : le LA, les villosités chorales et le sang fœtal. Ces trois tissus fournissent des cellules adéquates pour l'analyse cytogénétique mais chaque tissu et les techniques de laboratoire mises en place modulent quelque peu l'indication clinique de l'analyse cytogénétique.

1-1 Liquide amniotique

C'est une technique de routine bien établie. L'utilisation de milieux de culture adéquats, de facteurs de croissance, d'incubateurs perfectionnés, a permis ces dernières années d'améliorer le taux de succès et aussi la rapidité d'obtention de cultures cellulaires. Les cellules du LA proviennent de la peau, du rein, de la vessie, de l'intestin, de même que des membranes extra embryonnaires ; un très grand nombre de tissus fœtaux sont ainsi étudiés.

Le nombre total de cellules/ml de LA augmente avec l'âge gestationnel, mais toutes les cellules ne sont pas capables de se fixer sur le support et de former des colonies, et le nombre de cellules viables diminue au-delà de 32 SA.

1-2 Villosités chorales

Le prélèvement est habituellement réalisé à partir de la 11ème SA. Les villosités chorales sont formées histologiquement de trois tissus : le cytotrophoblaste, le syncytiotrophoblaste et le stroma villositaire. Un diagnostic rapide peut être posé (en 24 à 48 heures) par l'étude du cytotrophoblaste dont l'index mitotique est très élevé : c'est la technique directe ou semi directe. Les chromosomes sont cependant souvent courts et le niveau de résolution faible. Il est important de réaliser parallèlement une culture à partir de cellules de l'axe villositaire mésenchymateux. Les délais d'obtention des préparations sont alors sensiblement identiques à ceux de l'amniocentèse et le banding chromosomique plus satisfaisant. L'étude de ces deux tissus est complémentaire et nécessaire.

Des discordances entre le caryotype du cytotrophoblaste et du stroma villositaire et celui de l'embryon sont observées dans 1 à 2 % des cas (Mosaïque confinée au placenta) et l'étude

simultanée des deux tissus, cytotrophoblaste et stroma villositaire, permet d'améliorer la fiabilité du diagnostic.

1-3 Prélèvement de sang fœtal

Le PSF permet d'obtenir rapidement (72 heures) des métaphases en quantité suffisante pour réaliser une étude chromosomique de qualité. Le caryotype peut être réalisé soit par l'analyse directe de cellules sanguines nucléées, soit après une culture de 48 à 72 heures de lymphocytes fœtaux.

Techniques de préparations chromosomiques [226]

2-1 culture cellulaire

Deux techniques différentes de culture cellulaire sont utilisées suivant les laboratoires : la technique in situ et la technique en flacon. Dans la technique in situ, les différentes étapes nécessaires à l'obtention des préparations chromosomiques, choc, fixation, coloration, marquage, se font sur la lame d'origine. Les principaux avantages en sont la rapidité du diagnostic et la reconnaissance plus facile des mosaïques et pseudo mosaïques. Dans la technique en flacon, les cellules sont décollées de leur support et mises en suspension dans les solutions appropriées après centrifugations successives. L'avantage de cette technique est la possibilité d'obtenir des chromosomes avec un très bon niveau de résolution.

Les cellules sont cultivées dans des incubateurs à CO₂ pendant 7 à 10 jours. Le principe est d'obtenir un nombre suffisant de mitoses pour une analyse chromosomique. Cette analyse est faite sur 16 à 20 cellules obtenues à partir du même prélèvement (voire plus si suspicion de mosaïque).

Le laboratoire reçoit un prélèvement d'une quantité variable de LA (en moyenne 20 ml).

Après avoir procédé à l'identification de ce prélèvement (afin d'éviter toute erreur d'étiquetage), et noté l'aspect macroscopique du liquide (clair, rosé, sanglant ou teinté), le LA est également réparti dans plusieurs boîtes de pétri de 35mm de diamètre au fond desquelles est placée une lamelle de verre de 30mm de diamètre.

Un milieu de culture est adjoint dans chacune des boîtes à raison de 1,5ml. Ces milieux nutritifs utilisés pour les cultures cellulaires comportent un milieu de base composé d'un mélange de sels minéraux, d'acides minéraux, et de vitamines ; un des milieux le plus fréquemment utilisé pour les cellules amniotiques est le milieu HAM F 10. A ce milieu sont additionnés, pour un flacon de 400ml :

- 5 ml de substitut de sérum : Ultrosor G
- 3 ml de bicarbonate pour équilibrer le PH
- 5 ml de glutamine à 200 mmol/l
- 1 flacon de pénicilline-streptomycine ou de kanamycine

Il faut souligner qu'il existe des milieux composites déjà préparés avec ces divers éléments, en particulier le milieu de Chang.

Par mesure de sécurité technique, deux lots différents de milieu de croissance sont utilisés de façon parallèle et deux étuves différentes recevront les cultures. Ainsi, les Boîtes de Pétri de départ sont séparées en deux groupes de boîtes cultivées dans des conditions de milieux et d'études différentes. Ce procédé permet d'éviter les échecs de culture par contamination microbienne, souillure ou panne d'étuve.

Les boîtes de Pétri sont placées dans leur étuve respective. Ces étuves sont à 37°C à circuit d'air CO₂, ce qui permet de maintenir le PH du milieu à 7,3. Initialement, aucune manipulation des boîtes n'est effectuée pour permettre la fixation des cellules sur les lamelles (4 premiers jours). Puis il est procédé au changement du milieu de culture deux fois par semaine : le milieu de culture est aspiré à la pipette et remplacé par un milieu de croissance frais.

A partir du 9^{ème} jour de mise en culture, les boîtes sont examinées au microscope inversé pour suivre la formation des premiers foyers de cellules. Dès que les colonies de cellules sont suffisamment abondantes, les cellules sont bloquées en métaphase en ajoutant un poison du fuseau mitotique, en général la colchicine. Les cellules sont ensuite traitées par une solution hypotonique, fixées et étalées.

– Le choc hypotonique :

Chacune des lamelles est retirée du milieu de culture puis plongée dans un milieu hypotonique et placée dans l'étuve à 37°C pour incubation pendant 15 minutes. Le milieu

hypotonique est constitué de 30 ml de Hanks dilué dans 280 ml d'Evian, et porté à 37°C. Il n'est pas nécessaire d'utiliser la colchicine, compte tenu de la relative synchronisation induite par les changements de milieu. On obtient ainsi une moindre condensation chromosomique, ce qui permet d'augmenter la définition de l'analyse après marquage.

– La fixation :

Après l'incubation, les lamelles sont placées dans du Carnoy contenant un volume d'acide acétique pour trois volumes d'éthanol. Puis on laisse sécher spontanément les lamelles, à l'air ambiant, avant de procéder à la coloration des chromosomes.

2-2 Interprétation des préparations chromosomiques

Les lames ainsi obtenues sont alors :

– soit colorées par le Giemsa de façon uniforme ; c'est la technique de « coloration ordinaire », qui permet seulement un classement des chromosomes suivant leur taille et la position du centromère en chromosomes métacentriques (exemple : chromosomes 1 et 3) ou sub-métacentriques (exemple : chromosomes 4 ou 5), ou encore acrocentriques (exemple : chromosomes 13, 14, 15, 21, 22). La coloration de Giemsa est composée de colorants basiques d'aminophénothiazine (azur, thionine et bleu de méthylène) et d'un colorant acide, l'éosine.

Cette coloration standard permet de déceler toutes les anomalies de nombre et un grand nombre des anomalies de structure.

– soit traitées de manière à faire apparaître sur les chromosomes une alternance des bandes sombres et claires ; ce sont les techniques de marquage ou banding chromosomique ; la succession des bandes est caractéristique de chaque paire chromosomique donnée.

2-3 Les techniques de marquage chromosomique

L'avantage de ces techniques de marquage est de faire apparaître, sur la structure des chromosomes, des bandes d'intensité différentes. Ce qui permet de reconnaître chaque paire chromosomique, d'identifier et de localiser les anomalies chromosomiques.

L'International System for Human Cytogenetic Nomenclature [227] fournit des idéogrammes ou représentations de chaque chromosome correspondant à environ 400, 550 ou 850 bandes par set haploïde de chromosomes. Le bras court est désigné p, le bras long q ;

chaque bras est divisé en régions, elles-mêmes subdivisées en bandes ou en sous-bandes. Ce type de nomenclature, le plus généralement admis, permet de définir les points de cassure lors de remaniements.

Le marquage chromosomique est le reflet d'une organisation différente de l'acide désoxyribonucléique (ADN) le long du chromosome : de larges séquences d'ADN riches en A-T alternent avec de grandes séquences d'ADN riches en G-C ; dans certaines régions spécifiques, de l'ADN hautement répétitif s'intercale. La plupart des techniques de bandes sont liées à une action directe des réactifs sur l'ADN.

Plusieurs procédés sont utilisés. Ils sont désignés par une lettre majuscule selon le principe de coloration utilisé ou le point de localisation que révèle la technique. Il est décrit 3 types de marquage :

- deux types pour l'euchromatine, c'est-à-dire les segments non variables. Ce sont d'une part les bandes Q et G de même localisation et qui colorent environ 50% de l'euchromatine, et d'autre part les bandes R qui colorent le reste.
- Un pour l'hétérochromatine qui correspond au marquage C localisé le plus souvent aux régions centromériques.

a-Les bandes Q

Les bandes Q sont observées au microscope à fluorescence, après que les lames aient été placées dans une solution de quinacrine (ce colorant étant fortement fluorescent à la lumière U.V). Les chromosomes, par ce procédé de marquage, présentent une alternance de bandes sombres et brillantes dont la séquence est spécifique d'une paire donnée. (L'intensité de la fluorescence, proportionnelle à la richesse de l'ADN en A-T, varie fortement le long du chromosome.)

b-Technique des bandes G

Elle est la plus utilisée dans le monde. Les bandes G sont mises en évidence par le giemsa après que les lames aient été soumises à l'action protéolytique de la trypsine ou autre protéase. Les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et claires dont la topographie est identique à celle de bandes Q ; les bandes sombres correspondant généralement aux séquences d'ADN de réplication tardive riche en A-T, contenant peu de gènes actifs.

c–Technique des bandes R

Les bandes R (reverse banding) sont mises en évidence par le Giemsa après que les lames aient été traitées dans une solution saline à 87degres. Les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et de bandes claires dont la topographie est réciproque de celle des bandes G ou Q. Elles correspondent aux régions du génome riches en cytosine et guanine.

d–Bandes C

Les bandes C (centromère) sont mises en évidence par le Giemsa après que les lames aient été traitées successivement dans une solution d'acide chlorhydrique puis dans une solution d'hydroxyde de baryum. Par cette technique, les chromatides apparaissent uniformément pâles. Les régions centromériques, les constriction secondaires et la partie distale du bras long du chromosome Y sont les seules à apparaître fortement colorées.

Sur un chromosome donné, la taille de la bande C est constante d'une cellule à l'autre, mais est variable d'un individu à l'autre, réalisant un polymorphisme.

e–Technique NOR

Les régions contenant les gènes transcrits en acides ribonucléiques (ARN) ribosomiaux 18S et 28S (organisateurs nucléolaires) sont localisées chez l'homme sur les bras courts des chromosomes acrocentriques et peuvent être colorées par le nitrate d'argent (NOR–staining). La taille de ces régions est très variable d'un individu à l'autre mais reste inchangée d'une génération à la suivante, pouvant servir également de marqueur familial.

La résolution (nombre de bandes obtenues par génome haploïde, en comptant les chromosomes X et Y) d'un caryotype standard est de 300 à 400 bandes par lot haploïde. Avec des artifices, en travaillant sur des chromosomes en prométaphase (chromosomes plus allongés), il est possible d'obtenir un caryotype haute résolution, comprenant environ 1200 bandes par génome haploïde ou de résolution intermédiaire. La résolution obtenue est très différente selon le prélèvement considéré : l'étude directe d'un trophoblaste permet d'obtenir une résolution entre 300 et 400 bandes, la culture de trophoblaste ou de liquide amniotique permettent d'obtenir une résolution entre 400 et 500 bandes, alors que le sang fœtal permet d'obtenir une résolution autour de 550 bandes.

Le caryotype est l'examen cytogénétique le plus souvent prescrit en présence de certains syndromes cliniques bien caractérisés (une T21 par exemple), devant la plupart des syndromes poly malformatifs observés à la naissance ou suspectés par l'examen échographique, devant des troubles de la reproduction (avortements répétés ou stérilité) et devant certains retards mentaux. Le diagnostic d'une anomalie chromosomique est important car il permet un conseil génétique précis.

Les techniques classiques d'analyse des bandes chromosomiques sont utilisées en 1^{ère} approche, ils permettent le diagnostic d'anomalies chromosomiques portant sur le nombre et la structure des chromosomes.

Les remaniements visibles grâce à l'utilisation de ces techniques ont une taille de plusieurs millions de paires de bases (1 million de paires de bases = 1 mégabase ou 1 Mb).

Cependant, dans certains cas, le cytogénéticien se trouve en présence d'anomalies chromosomiques difficiles à caractériser du fait de leur petite taille ou de leur complexité.

Parfois même en présence de signes fortement évocateurs d'une anomalie chromosomique (syndrome poly malformatif associé à un retard mental, une dysmorphie et avec récurrence familiale), aucune anomalie chromosomique n'est retrouvée.

Il peut s'agir alors de déséquilibres chromosomiques dont la taille est inférieure à la résolution des techniques de bandes qui est en moyenne de 5–10Mb, c'est à dire la taille d'une bande chromosomique.

Ces limites, liées au niveau de résolution, ont amené à introduire la biologie moléculaire dans l'arsenal des techniques d'analyse cytogénétique.

II. LA CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

Le DPN génotypique de maladie héréditaires consiste à utiliser l'ADN ou l'ARN de cellules fœtales afin de déterminer si le fœtus sera atteint de la maladie, soit de façon directe en recherchant la ou les maladies génétiques responsables, soit de façon indirecte en repérant les allèles d'un marqueur polymorphe associé. Dans cette deuxième approche, le diagnostic n'est rendu qu'avec une certaine probabilité, notamment en fonction du risque de recombinaison génétique.

1 – Outils et stratégies de la génétique moléculaire :

Il existe une grande variété d'outils d'étude des anomalies génétiques. Certains permettent de mettre en évidence des remaniements géniques (macro-lésions), d'autres permettent de détecter n'importe quelle anomalie ponctuelle dans une séquence d'acide nucléique donnée (outils de balayage), d'autres encore visent à rechercher de façon ciblée une ou plusieurs anomalies moléculaires (outils de criblage). Le choix des techniques dépend des paramètres suivants :

- de la maladie et de la pathologie moléculaire
- de la structure du gène
- des outils disponibles (existence ou non de trousse commercialisées, équipement du laboratoire)

Toutes les méthodes ont leurs limites et il ne serait pas judicieux de vouloir imposer une technologie particulière pour une application donnée.

1-1 Hybridation moléculaire [228]

C'est l'appariement de deux chaînes monocaténares d'acides nucléiques d'origine différente. Cette association s'effectue par l'intermédiaire des liaisons « hydrogène » établies entre les bases complémentaires des deux hybrides ; il en résulte que :

- l'hybridation peut s'établir entre deux molécules d'ADN, deux molécules d'ARN, ou une molécule d'ADN monocaténaire et une molécule d'ARN, à la condition que leurs bases soient complémentaires ;
- l'hybridation entre deux acides nucléiques est d'autant plus stable que la séquence des bases complémentaires assurant la cohésion des hybrides est plus longue.

Ce principe de l'hybridation moléculaire est utilisé pour la détection des acides nucléiques dans les tissus. L'acide nucléique (un gène ou un ARN messager) peut être identifié à l'aide d'une sonde nucléique spécifique (séquence polynucléotidique dont les bases sont strictement complémentaires de celles de l'acide nucléique recherché et préalablement radiomarquée). L'hybridation, c'est-à-dire l'appariement entre la sonde et l'acide nucléique sera révélé grâce au traceur isotopique couplé à la sonde. La spécificité de l'hybridation entre la sonde et sa cible est assurée par les conditions physicochimiques de la réaction, et surtout celles des étapes de rinçage après hybridation (les températures de rinçage se

situent à quelques degrés au-dessous de la température de fusion) permettant d'éliminer tous les appariements incomplets et de ne garder que les hybrides entre l'acide nucléique d'intérêt et la sonde.

1-2 Sondes nucléiques [229]

Une sonde est une séquence d'acide nucléique, préalablement marquée, complémentaire de celle que l'on cherche à détecter dans un tissu et que l'on pourra identifier après l'hybridation avec sa cible.

Plusieurs types de sondes sont utilisés :

- les sondes ADN : il s'agit d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire ;
- les sondes ARN : ce sont des sondes monocaténares ribonucléotidiques, les tailles des sondes ADN ou ARN varient entre 100 pb et 3 kb ;
- les sondes oligonucléotidiques : il s'agit habituellement de sondes synthétiques produites par un synthétiseur nucléotidique automatique ; leur taille varie entre 18 et 50 bases

1-3 Différents méthodes d'hybridation

Les sondes nucléiques, quelle qu'en soit la nature (ADN, ARN, oligonucléotides), permettent d'identifier dans les tissus, les acides nucléiques dont la séquence nucléotidique est complémentaire de celle de la sonde utilisée.

1-3-1 Hybridation sur filtre [230]

–Southern blot

Décrite par Southern en 1975, cette méthode permet l'analyse de l'ADN ; après extraction et purification, celui-ci est coupé par une ou plusieurs enzymes de restriction et les fragments ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose selon leur taille.

L'identification d'une séquence d'intérêt au sein de ces fragments par hybridation moléculaire n'est pas directement réalisable dans le gel d'agarose (perte de l'ADN en cours d'hybridation, mauvaise diffusion de la sonde, etc.).

Les fragments de restriction, séparés par électrophorèse, sont alors dénaturés par un traitement alcalin (par immersion du gel dans une solution 0.2N NaOH) puis transférés par

simple capillarité sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon où ils s'attachent de façon covalente. La cuisson du filtre à 80°C ou son exposition aux rayons ultraviolets rend irréversible la fixation de l'ADN sur le filtre. Le transfert par capillarité préserve la séparation des fragments d'ADN selon leur taille.

Une première étape de préhybridation du filtre est nécessaire pour saturer les sites non spécifiques sur lesquels pourrait s'accrocher la sonde : elle s'effectue dans un tampon riche en macromolécules telles que l'ADN de sperme de saumon, et la solution de Denhart ; en l'absence de formamide, la température de préhybridation est de 65°C.

L'hybridation consiste à incuber le filtre à une température de 65°C, dans le même tampon que précédemment, en présence de la sonde radioactive préalablement dénaturée. La durée moyenne de l'hybridation est de 12 à 16 heures.

Après l'hybridation, les étapes de rinçages vont permettre d'éliminer la sonde fixée de façon non spécifique sur le filtre, ou partiellement accrochée à des fragments d'ADN non pertinents. Ces rinçages s'effectuent dans des conditions de stringence progressivement croissantes (la stringence correspond aux forces physicochimiques de dissociation des hybrides). L'hybridation est révélée par autoradiographie.

–Northern blot

Par analogie à la méthode décrite par Southern pour analyser l'ADN, le terme de Northern blot a été attribué à la technique permettant l'analyse de l'ARN. Après extraction et purification, les ARN (ARN totaux ou ARN poly-A) sont chargés sur un gel d'agarose dénaturant. Les différents ARN, ainsi séparés selon leur taille, sont directement transférés sur un filtre puis hybridés selon les techniques déjà décrites.

–Dot blot

Il s'agit de techniques d'hybridation d'ADN ou d'ARN sur filtre sans électrophorèse initiale ; les échantillons, après dénaturation, sont déposés directement sur le filtre, puis hybridés. Ces méthodes ne permettent donc pas de préciser la taille de l'acide nucléique recherché, et imposent le contrôle initial de la spécificité de la sonde par Southern ou Northern blot. Ces techniques sont simples, rapides, et permettent l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons.

1-3-2 Hybridation in situ

Cette méthode consiste à identifier les acides nucléiques directement dans les cellules ou les tissus. Elle présente deux avantages par rapport aux techniques d'hybridation sur filtre : d'une part, elle permet d'identifier précisément la localisation de l'acide nucléique étudié au sein d'une population cellulaire hétérogène, et d'autre part, elle apporte un gain de sensibilité lorsque l'acide nucléique d'intérêt est concentré dans un petit nombre de cellules au sein d'un tissu.

L'hybridation est réalisée directement sur des cellules centrifugées sur lames de verre, sur des cryosections tissulaires ou encore des coupes incluses en paraffine.

La méthode varie selon le type d'acide nucléique recherché.

- La détection de l'ADN (identification de particules virales, étude de l'amplification d'oncogènes), utilise habituellement des sondes d'ADN double brin. La sonde en solution est déposée sur l'échantillon tissulaire, recouverte par une lamelle scellée par un trait de glu. La lame est alors chauffée à 100 °C pendant environ 10 minutes pour permettre la dénaturation simultanée de l'ADN cellulaire et de la sonde. Les lames sont ensuite incubées 12 à 16 heures à 37 °C puis rincées dans plusieurs bains de stringence progressivement croissante afin d'éliminer les accrochages non spécifiques.

- La détection des ARN (virus ARN, ARN messagers) utilise soit des sondes ADN double brin, soit des sondes ARN ; l'ARN intracellulaire ne nécessite pas des conditions de dénaturation aussi importantes que précédemment : les sondes sont dénaturées séparément puis déposées sur lames. Le principal avantage des sondes ARN par rapport aux sondes ADN est la possibilité de réduire le bruit de fond par un traitement par la RNase A après l'hybridation. En effet cette enzyme respecte les hybrides ARN/ARN bicaténaires mais digère les fragments de sonde monocaténaires fixés de façon non spécifique ou partiellement hybridés.

La révélation de l'hybridation varie selon le type de marquage.

Les sondes froides (couplées à la biotine ou à la digoxigénine, ou modifiées par sulfonation) sont identifiées par des anticorps dirigés contre la molécule « reporter » et couplés à une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase) dont l'activité est révélée par un substrat chromogène.

2-Les prélèvements fœtaux et la génétique moléculaire :

2 types de prélèvements peuvent être programmés pour une étude de l'ADN fœtal : la PVC et l'amniocentèse. Exceptionnellement lorsqu'une PSF est indiquée pour un dosage des facteurs de la coagulation afin de rechercher une hémophilie (cette indication est devenue très rare), le laboratoire de génétique moléculaire peut secondairement être amené à identifier une anomalie génétique.

Les villosités chorales constituent le matériel biologique de choix lorsque la technique de Southern blot doit être appliqué au DPN (pour l'hémophilie A et le syndrome de l'X fragile par exemple). En effet elle exige de plus grandes quantités d'ADN (1 à 10 microgrammes) que la PCR (0,02 à 1 microgrammes). Il est donc important de pouvoir programmer un PVC qui fournit davantage de matériel que le liquide amniotique, surtout si une réalisation du caryotype s'avère nécessaire. L'expérience est pour l'instant insuffisante en génétique moléculaire pour déterminer la faisabilité d'études moléculaires sur le liquide amniotique prélevé précocement. L'analyse de quelques expériences a fait évoquer la présence d'inhibiteurs de la PCR présents à un stade précoce (avant 15 SA).

La PCR (Polymérase Chain Réaction)

3-1 Introduction

La PCR ou amplification enzymatique in vitro est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier de manière exponentielle une séquence donnée d'ADN [231]. Depuis la publication princeps de SAIKI et collaborateurs en 1985 [232], la puissance d'amplification va croissante et permet de décélérer aujourd'hui la séquence unique d'un gène.

Les premières applications de la PCR ont concerné la recherche de maladies génétiques, avec comme objectif principal le DPN [233]. On peut citer principalement les travaux sur l'hémophilie A, la drépanocytose, la β thalassémie ou la dystrophie musculaire de Duchenne.

Dans le domaine de la microbiologie, la détection de séquences virales dans divers prélèvements est maintenant possible.

La PCR est une technique de réplication ciblée in vitro, basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'ADN servant de matrice.

Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur est celui du million de copies en quelques heures.

3-2 Le principe [234] (figure)

Le principe de la PCR comprend schématiquement trois étapes : la dénaturation thermique, l'hybridation des amorces puis l'extension constituent un cycle, répété 20 à 30 fois (figure a-5).

–1^{ère} étape : dénaturation thermique.

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les 2 brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogène. L'ADN double brin est chauffé à une température élevée, de l'ordre de 95°. Cette température est supérieure à la température de fusion de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin dans le milieu. Ces brins serviront de matrice au cours des cycles d'amplification.

–2^{ème} étape : hybridation des amorces.

Le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des brins. Celle-ci détermine les bornes de la séquence à amplifier. Le milieu est amené à une température

inférieure au T_m des amorces. Les amorces, en large excès, s'hybrident à tout ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

– 3^{ème} étape : extension des amorces.

Une ADN polymérase allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice auquel est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens 5', 3', température optimale pour la plupart des enzymes. A la fin du cycle, 2 copies de la séquence d'ADN sont obtenues. Puis un nouveau cycle commence et ainsi de suite. A titre d'exemple, une PCR de 30 cycles génère théoriquement 2^{30} fois de chaque cible initialement présente.

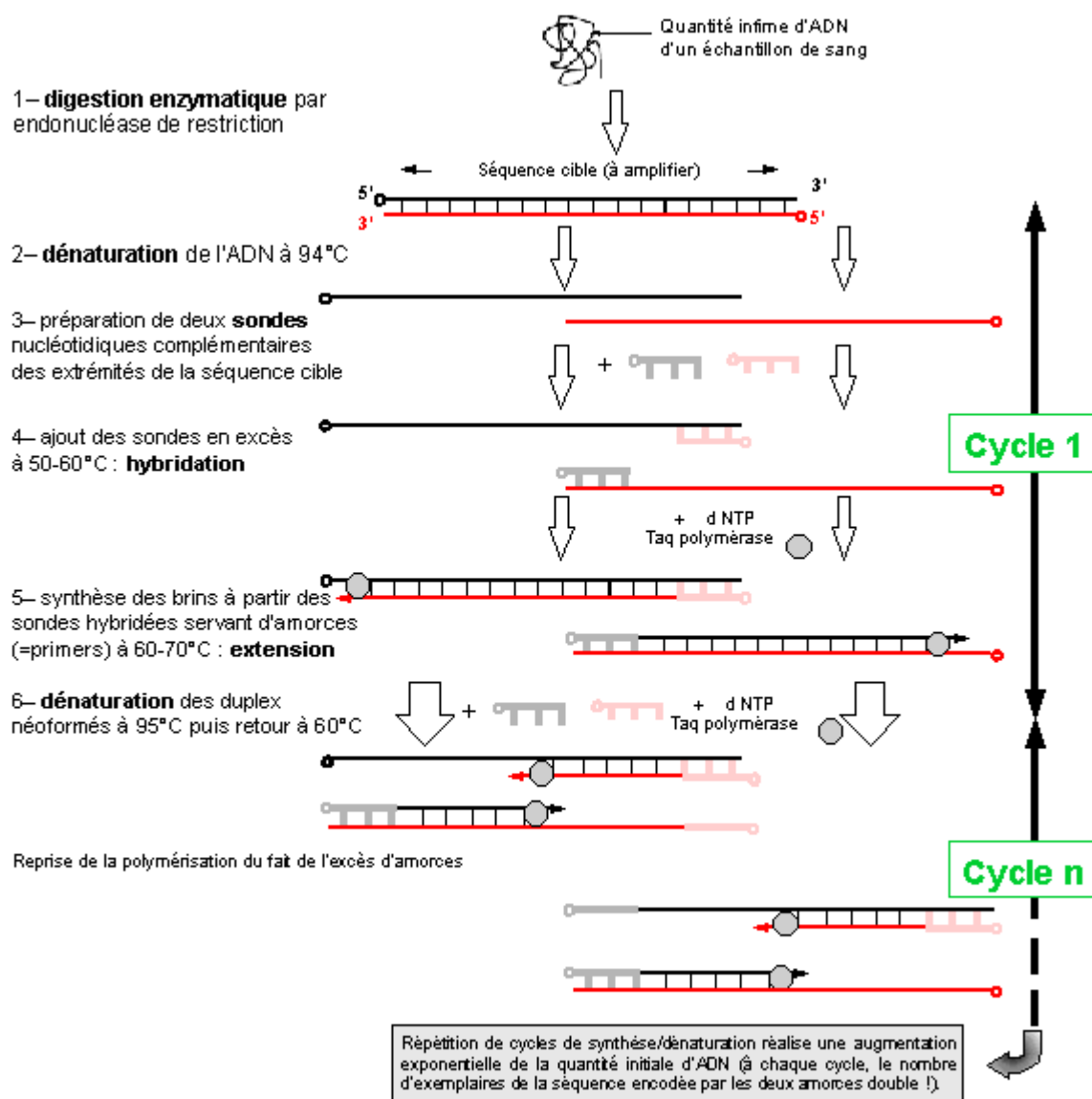


Figure 7 : Principe de la PCR

3-3 Les applications [235] :

- Mutations ponctuelles

On peut citer l'exemple de la recherche de la mutation du gène B globine responsable de la drépanocytose, qui fut la première application de la technique.

Un fragment de 110 pB, encadrant le site Mst II est amplifié. Le produit de réaction est analysé par électrophorèse après hydrolyse par Mst II : la présence de la mutation est révélée par l'absence de coupure.

Certaines mutations responsables de l'hémophilie A sont retrouvées de la même façon lors de l'analyse d'un fragment du gène facteur VIII. Dans ce cas, l'amplification intéresse un fragment porteur d'un site de restriction informatif (RFLP) : sa présence est décelée par la coupure enzymatique.

La PCR nécessite beaucoup moins d'ADN que le Southern-blot, ce qui est compatible avec un prélèvement par biopsie de trophoblaste dès la 10^{ème} semaine de grossesse, et le résultat est obtenu plus rapidement.

-Délétions

Des délétions importantes génèrent un polymorphisme de taille des fragments mutés par rapport à la normale. C'est le cas du gène codant pour la dystrophine dans la myopathie de Duchenne de Boulogne.

D'autres délétions, moins importantes, sont également aisément repérées par la PCR, comme $\delta F508$, qui correspond à la perte d'un codon dans le gène CF, retrouvé chez 70 p. 100 des malades atteints de mucoviscidose.

3-4 Avantages

❖ Facilité d'utilisation

L'avantage de la PCR est sa relative facilité de mise en oeuvre, si on la compare aux techniques traditionnelles de la biologie moléculaire.

❖ Rapidité

Il s'agit d'une technique rapide, 6 à 8 heures suffisent pour l'obtention d'un premier résultat.

❖ Sensibilité

La sensibilité est extrême puisqu'elle permet, dans des conditions limites, de travailler sur une seule cellule et de détecter une seule copie du fragment génomique recherché.

Depuis une quinzaine d'années sont apparues de nouvelles techniques d'étude des chromosomes qui allient les techniques de cytogénétique classique et les techniques de biologie moléculaire. Ces techniques permettent de diagnostiquer des anomalies non visibles en cytogénétique classique, avec une sensibilité nettement supérieure pour la détection des remaniements chromosomiques complexes ou de petite taille. L'ensemble de ces techniques constitue la cytogénétique moléculaire.

La cytogénétique moléculaire, reposant sur la FISH (Fluorescent hybridation In Situ), est un outil de diagnostic et de recherche très performant dont les applications sont à ce jour multiples.

4- L'hybridation in situ fluorescente (FISH)

4-1 Introduction

La technique d'hybridation in situ utilisant des sondes génomiques fluorescentes a complètement bouleversé le domaine de la cytogénétique et donc par la même occasion le DPN. L'hybridation in situ n'est pas une technique récente, elle est utilisée depuis de nombreuses années dans les laboratoires de recherche. Son essor est lié d'une part au marquage des sondes, et d'autre part à la commercialisation de sondes génomiques fluorescentes spécifiques d'une région chromosomique ou d'un chromosome donné. Les différents types de prélèvements : LA, villosités chorales et sang fœtal, peuvent être traités par FISH.

4-2 Principe [236] :

Son principe repose sur la propriété de l'ADN, molécule composée de deux brins de séquences nucléotidiques complémentaires, de se dénaturer (séparation de deux brins) et de se rénaturer (réassociation des brins complémentaires) dans des conditions précises de température, de salinité et de Ph.

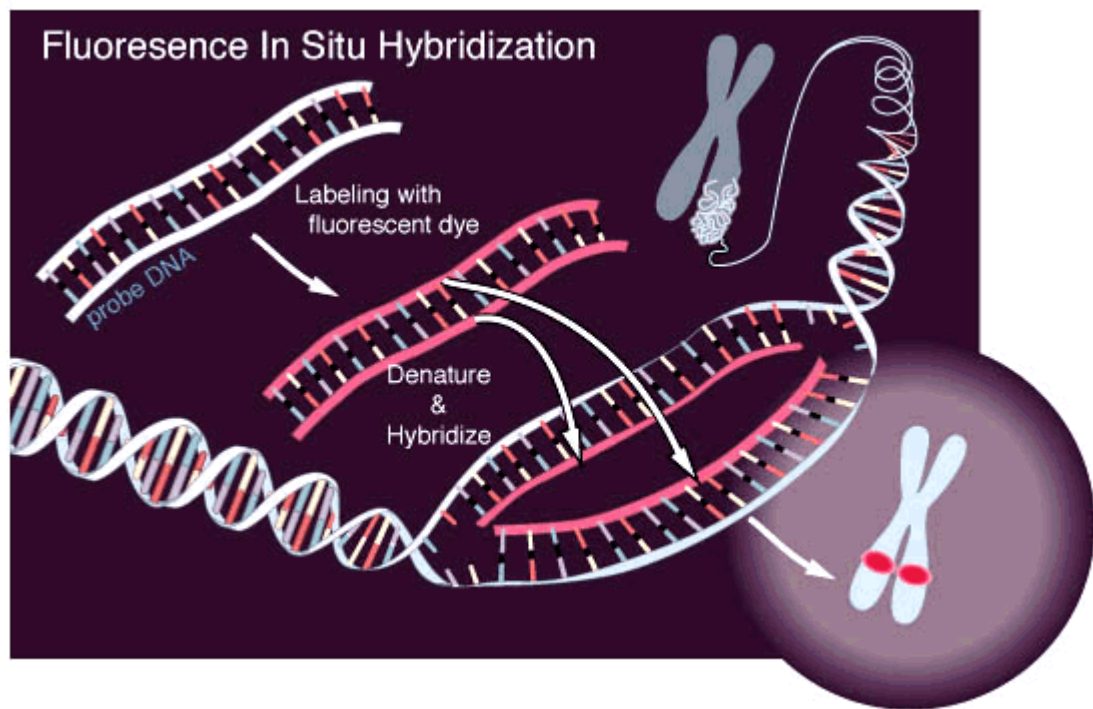


Figure 8 : principe de la FISH

Cette technique répond à toutes les étapes d'une technique de biologie moléculaire sur ADN génomique, exception faite de l'extraction de l'ADN puisqu'il s'agit d'une technique in situ.

a – La dénaturation

La dénaturation consiste à ouvrir la double hélice d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes. Elle est obtenue par chauffage pour aboutir à une température de fusion T_M qui correspond à la température limite permettant de dénaturer 50% de l'ADN. La T_M n'est atteinte qu'à des températures supérieures à 100°C qui ont pour effet de détruire la structure chimique de la cellule. Afin d'éviter cet effet, on ajoute au tampon de dénaturation la formamide qui abaisse la température de fusion.

b- Hybridation

Cette étape consiste en l'appariement, par leurs bases complémentaires, entre la sonde et la cible (ADN chromosomique ou interphasique).

c- Lavage post hybridation

Il est réalisé dans des conditions stringentes afin d'éliminer le bruit de fond et les hybridations non spécifiques.

d- La détection du signal

Certaines sondes sont directement marquées avec un fluorochrome, ce qui permet de visualiser sous la forme d'un spot fluorescent les sondes qui ont marqué les chromosomes explorés.

La visualisation du signal nécessite un microscope à fluorescence de haute résolution. Les images sont capturées sur un analyseur d'images.

En pratique on utilise un ou des fragments d'ADN dans lesquels ont été introduits chimiquement par « marquage » un ou plusieurs fluorochromes. Ce fragment d'ADN « marqué », appelé alors sonde, est dénaturé puis hybridé sur des préparations de chromosomes ou noyaux eux même préalablement dénaturés.

L'ensemble est mis à hybrider dans une chambre noire à 37°C durant une heure à 3 jours selon les sondes utilisées.

Le signal est ensuite observé à l'aide d'un microscope à épi fluorescence muni de filtres spécifiques capables de sélectionner, à partir de la lumière blanche émise par la source lumineuse du microscope, un faisceau d'une longueur spécifique excitatrice du fluorochrome intégré dans la sonde.

Celui ci émet alors un faisceau lumineux que l'on visualise directement sur les préparations cellulaires ou qui est numérisé par une caméra branchée sur le microscope puis observé sur l'écran d'un ordinateur et analysé avec un logiciel spécifique.

La combinaison de plusieurs fluorochromes permet d'hybrider simultanément plusieurs sondes d'ADN marquées différemment, ce qui rend alors possible la détection des remaniements de structure impliquant plusieurs chromosomes.

Parallèlement, l'existence d'un panel de plus en large de sondes spécifiques d'une région chromosomique ou de chromosomes entiers a permis d'accroître les indications de la cytogénétique, tant en clinique qu'en recherche.

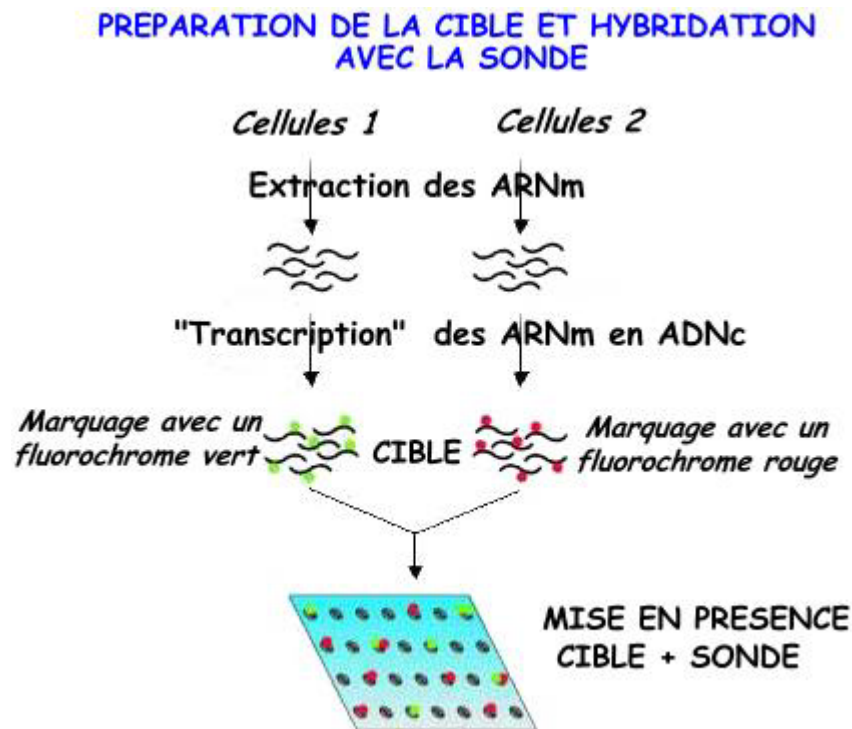


Figure 9 : principe de l'hybridation

4-3 Sondes :

Les sondes utilisées en cytogénétique sont des sondes ADN bicaténares ou monocaténares. Elles peuvent être synthétisées par chaque équipe en utilisant des vecteurs (plasmides, cosmides, YACs) permettant de cloner un fragment d'ADN génomique humain [237]. Aujourd'hui, les cytogénéticiens utilisent de plus en plus de sondes commercialisés prêtes à l'emploi [238]. Quatre grandes catégories de sondes sont disponibles pour analyser et préciser la nature des anomalies chromosomiques

a-Sondes spécifiques d'un locus donné

Ces sondes sont générées par identification et amplification de segments d'ADN spécifiques d'un locus donné, clonés à l'intérieur d'un phage, d'un cosmide, d'un BAC (Bacteria Artificial Chromosome), d'un PAC (Phage Artificial Chromosome) ou d'un YAC (Yeast Artificial chromosome).

Elles sont particulièrement utiles à la détection de délétions ou de duplications infracytogénétiques de certaines régions du génome. Il s'agit de délétions qui ne sont pas visibles sur un caryotype standard, ou à la limite de la visibilité en technique haute résolution, mais dont le diagnostic devient possible en utilisant les techniques d'hybridation in situ. C'est ainsi que l'on réalise, par exemple, le diagnostic du syndrome de Prader Willi en utilisant la sonde 15q11, du syndrome de Wolf Hirschhorn en utilisant la sonde 4q16, et le syndrome de Di-George en utilisant la sonde 22q11.

L'utilisation de sondes spécifiques permet également de déterminer les points de cassure d'une translocation héritée ou spécifique d'une tumeur.

b-Sondes alphoides ou centrométriques

Les ADN satellites constituent environ 10 à 20 % de l'ensemble de l'ADN humain. Ils diffèrent en fonction de leur localisation dans le génome ainsi que de la longueur des séquences répétées. L'unité monomérique qui forme les séquences d'ADN alpha satellite varie considérablement d'un chromosome à l'autre, rendant ces séquences spécifiques de tel ou tel chromosome.

Un bon nombre de ces sondes sont commercialisées à ce jour. Elles peuvent être utilisées indifféremment sur noyaux en interphase, sur chromosomes en métaphase ou sur du tissu. Elles permettent de rechercher une éventuelle aneuploïdie, homogène ou en mosaïque, ainsi que d'assurer le suivi d'une greffe de moelle osseuse quand le donneur et le receveur sont de sexe différents.

c- Sondes télomériques

Elles sont spécifiques des extrémités des chromosomes. Il existe des sondes pantélomériques qui colorent simultanément tous les télomères et des sondes spécifiques de chaque télomère qui sont en fait sub-télomériques.

d-Peintures chromosomiques ou sondes de painting

On peut par différentes techniques obtenir des sondes hybridant spécifiquement et entièrement une paire chromosomique donnée. Ces sondes sont appelées sondes de peinture chromosomique, obtenues soit par microdissection, soit par triage chromosomique ou grâce aux hybrides somatiques contenant un seul chromosome humain. Depuis cinq ans, grâce à des combinaisons spécifiques de 5 fluorochromes, il est actuellement possible d'obtenir 24 sondes spécifiques de 22 autosomes et des chromosomes X et Y permettant de réaliser un caryotype en multifuorescence. Elles sont particulièrement utiles pour différencier les remaniements inter et intra chromosomiques et pour l'étude des translocations complexes, en particulier lorsqu'il faut vérifier l'existence de l'implication de tel ou tel chromosome dans un remaniement. C'est par exemple le cas en pathologie chromosomique prénatale quand on est en présence d'une translocation apparemment équilibrée qui en réalité implique plusieurs chromosomes.

Enfin, ces sondes peuvent être employées seules ou être combinées entre elles pour obtenir un marquage multicolore permettant une interprétation plus aisée de certains remaniements.

4-4 intérêts de la FISH

Le premier intérêt de cette technique est sa rapidité. En effet sa réalisation ne nécessite pas de mise en culture des cellules prélevées, contrairement aux techniques classiques. Ainsi les résultats vont pouvoir être rendus 12 à 24 heures après les prélèvements contre 2 à 3 semaines pour un caryotype, dans les situations où le fœtus présente un risque important d'anomalie chromosomique et où il est important d'avoir un résultat rapide, cette technique va permettre de guider l'attitude obstétricale. Un autre avantage important est qu'elle ne nécessite qu'une faible quantité de matériel (2 à 5ml de LA, quelques milligrammes de villosités chorales).

L'une des applications majeures de la FISH est la possibilité d'étudier le contenu génomique des cellules à partir des noyaux en interphase. Avec les techniques de bandes on ne peut étudier que les métaphases qui représentent au maximum 20% des cellules sur une préparation de cytogénétique. L'hybridation de sondes centromériques ou de toute autre sonde générant un signal ponctuel et fort permet de repérer un ou plusieurs locus dans des noyaux en interphase. On peut ainsi dénombrer rapidement les chromosomes identifiés par ces sondes sur un grand nombre de cellules. Cette technique permet d'effectuer des diagnostics rapides, en 1 à 16 heures, aneuploïdies complètes ou en mosaïque, syndromes microdélétionnels, ambiguïté sexuelle, qui peuvent être particulièrement utiles en période prénatale (suspicion de trisomie 21 à 35 semaines d'aménorrhée) ou en période néonatale (suspicion de trisomie ou ambiguïté sexuelle)

Ainsi, trois types d'applications prénatales sont maintenant possibles [237] :

– Quand des anomalies chromosomiques « imprévues » sont détectées ou suspectées par les techniques de bandes de cytogénétique lors d'une amniocentèse de dépistage, la FISH est couramment utilisée pour caractériser ces anomalies, simplifiant grandement le conseil génétique. Il s'agit des chromosomes marqueurs surnuméraires, des réarrangements chromosomiques.

– Devant un signe d'appel échographique au 3e trimestre, la FISH sur noyaux en interphase avec des sondes centromériques ou spécifiques de loci permet d'obtenir rapidement un diagnostic d'aberration chromosomique en évitant la culture cellulaire. On peut donc, avec une simple amniocentèse, faire en urgence le diagnostic prénatal des aneuploïdies concernant les chromosomes X, Y, 13, 18 et 21.

Klinger publie en 1992 ses résultats sur 4500 échantillons avec un taux de dépistage des aneuploïdies de 73,3% (107/146) [237].

Cependant, l'intérêt clinique de la FISH est limité par un taux non négligeable de résultats non interprétables (10–30 %). D'autre part les anomalies ciblées par l'examen ne représentent que 60–70 % des anomalies chromosomiques pouvant être retrouvées en période prénatale. On ne

pourra donc conclure avec certitude à la normalité qu'après le résultat des cultures. Enfin, si une décision d'interruption de grossesse est prise, il faut être absolument certain que le résultat soit sans ambiguïté possible.

-Le diagnostic des microremaniements chromosomiques inaccessible par les techniques conventionnelles [239] : il s'agit le plus souvent de microdélétions ou de microduplications associées à des syndromes cliniques bien individualisés et suspectées, soit par échographie soit par l'examen foetopathologique après interruption de grossesse pour polymalformation.

La taille de ces remaniements est de l'ordre de 1 à 5 mégabases, c'est-à-dire à la limite ou en dessous du pouvoir de résolution des techniques de bandes.

L'étude moléculaire des microdélétions a révélé, de part et d'autre des ponts de cassure, l'existence de séquences répétées d'ADN, appelées duplicons, espacées de 1,5 Mb à 5 Mb. Ces duplicons sont à l'origine de recombinaisons illégitimes au cours de la méiose expliquant de ce fait la survenue de microdélétions, microduplications et d'inversions [240,241]. La mise en évidence d'une microdélétion du chromosome 22 responsable du syndrome de Di-George chez un fœtus porteur d'une cardiopathie conotruncale dépistée à l'échographie est une des applications les plus courantes en prénatal.

Notons enfin que l'application la plus spectaculaire de la FISH sur noyaux en interphase est le DPI des anomalies chromosomiques. Ce diagnostic est proposé aux couples porteurs d'une anomalie chromosomique bien caractérisée à haut risque de déséquilibre transmissible à la descendance. L'utilisation de sondes télomériques permet, après hybridation sur un blastomère prélevé au stade de morula non compactée de repérer les déséquilibres chromosomiques et de ne réimplanter que les embryons non porteurs de ces déséquilibres.

L'inconvénient majeur des techniques de FISH sur noyaux est qu'elle permet uniquement d'identifier la présence ou non de la séquence génomique reconnue par la sonde. La FISH ne permet pas d'éliminer complètement toute anomalie chromosomique comme le fait le caryotype (dans les limites de sa résolution). Elle ne nous donne aucune information sur le nombre et la structure des autres chromosomes, ni sur la structure du chromosome étudié.

Une étude rapportée par Evans et ses collaborateurs portant sur 146000 diagnostic prénatals a montré que seulement 70% des anomalies chromosomiques retrouvées auraient pu être détectées par la FISH en utilisant les 5 sondes sur LA non cultivé. Les anomalies ne pouvant être détectées concernaient des anomalies de structure, équilibrées ou non. [242]. Une autre limite réside dans la détection d'une aneuploïdie en mosaïque qui est de diagnostic et d'interprétation délicate. Il s'agit le plus souvent de mosaïques concernant les chromosomes XY, ou, en cas de PVC, de mosaïques confinées au placenta. Les contaminations des prélèvements par des cellules maternelles sont également difficiles à interpréter mais le grand nombre de cellules analysées permet de minimiser le risque de faux négatifs qui supposerait une contamination massive par des cellules maternelles.

C'est pour ces plusieurs raisons qu'actuellement, aucun résultat ne peut encore être suivi d'une IMG, avant confirmation du caryotype par les méthodes classiques de cytogénétique. Effectivement c'est toujours le caryotype final qui est considéré comme la traduction exacte de la constitution chromosomique du fœtus.

Il est donc admis par tous que l'hybridation in situ ne remplace pas le caryotype. Elle présente l'avantage de donner un résultat rapide en 24 heures, mais seulement pour les anomalies de nombre des chromosomes testés.

Comme nous venons de le voir, la FISH représente un examen indispensable pour le diagnostic de certaines anomalies chromosomiques, mais elle n'explore qu'une petite partie du génome.

Depuis quelques années se sont développées de nouvelles techniques de cytogénétique moléculaire permettant une étude globale du génome : il s'agit du caryotype en multi fluorescence et de l'hybridation génomique comparative (CGH) qui permettent d'identifier, l'un les échanges inter chromosomiques, l'autre les déséquilibres du génome, avec une sensibilité supérieure à celle du caryotype en bandes. Ces techniques restent cependant réservées à des patients sélectionnés sur des critères cliniques et cytogénétiques précis et, sauf cas très particuliers, sont indissociables de l'étude cytogénétique classique.

5-Le caryotype en multi fluorescence

Le caryotype multiplex ou M-FISH [243] et le caryotype spectral ou SKY [244] sont les deux méthodes utilisées pour sa réalisation.

Leur principe repose sur la cohybridation simultanée de sondes de peinture chromosomiques spécifiques de chacun des 24 chromosomes (22 autosomes et les chromosomes X et Y). Ceci donne une signature spectrale caractéristique à chaque paire de chromosomes (c'est-à-dire des couleurs différentes en raison des proportions variables de fluorochrome sur chaque chromosome). Les chromosomes sont classés sur la base de leur fluorescence spécifique. On obtient alors un caryotype en multi fluorescence. De nombreux travaux ont déjà montré l'efficacité du SKY comme du M-FISH pour l'identification des marqueurs chromosomiques en cancérologie comme en pathologie constitutionnelle [245] [246].

La multi-FISH permet de peindre spécifiquement tous les chromosomes à l'aide de sondes réparties tout au long du génome. La combinaison de ces différentes sondes couplées judicieusement à 5 fluorochromes différents, va générer une couleur propre à chaque paire chromosomique. Cette technique va permettre une analyse globale du génome. Elle est surtout très utile dans la mise en évidence de remaniements chromosomiques complexes ou par l'identification de chromosomes marqueurs, en permettant l'identification des chromosomes concernés. Enfin, un des avantages de cette technique est qu'elle est utilisable sur des métaphases de mauvaise qualité. L'inconvénient majeur est son prix dû au nombre important de sondes utilisées.

Cependant, ces techniques basées sur l'utilisation des sondes de peinture ne permettent pas l'étude des déséquilibres intrachromosomiques, mais uniquement celle des échanges entre chromosomes et celle de la composition des chromosomes anormaux.

6-L'hybridation génomique comparative (CGH) :

6-1 Introduction

En 1992, Kallionémi et ses collaborateurs décrivent une nouvelle technique de cytogénétique moléculaire appelée CGH [247].

A la différence des techniques classiques de FISH ou l'étude est réalisée sur les chromosomes ou les noyaux des patients, la CGH utilise l'ADN du patient comme sonde.

6-2 Principe

Son principe consiste à cohybrider une même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin marqué chacun par un fluorochrome différent (rouge et vert le plus souvent), sur les métaphases d'un sujet normal. Après révélation, le signal est numérisé et le rapport entre l'intensité de l'émission des 2 fluorochromes le long de l'axe de chaque chromosome est établi par un témoin. C'est une étude globale du génome permettant à partir de l'ADN d'un patient de détecter un déséquilibre génomique globale avec un pouvoir de résolution de l'ordre de 5-10Mb [248].

Initialement utilisée pour la détection des déséquilibres génomiques dans les tumeurs solides (sein notamment), la CGH a jusqu'à présent été peu employée dans les laboratoires de routine de cytogénétique constitutionnelle du fait des exigences techniques qu'elle impose. C'est pourtant la technique d'étude globale du génome la plus performante pour le diagnostic des déséquilibres génomiques.

6-3 Applications

Ses applications sont nombreuses :

-Identification de fragments chromosomiques transloqués ou insérés dans un chromosome et détectés au préalable par la technique de bandes. Elle constitue une alternative aux méthodes plus longues et moins précises de FISH avec les sondes de peinture.

-détermination de microremaniements dès lors que leur taille est supérieure à 5Mb. C'est ainsi qu'il a été récemment montré que la CGH permettait non seulement le diagnostic de microremaniements interstitiels difficilement détectables par les techniques classiques mais

aussi celui de la majorité des anomalies télomériques. Elle constitue donc une alternative à la FISH avec des sondes subtélomériques.

6-4 Conclusion

La CGH paraît être à ce jour la technique de choix à utiliser en cytogénétique constitutionnelle devant un tableau clinique de retard mental associé à des signes évocateurs d'anomalie chromosomique mais s'accompagnant d'un caryotype normal. Elle reste cependant techniquement délicate à mettre en œuvre. Une de ses limites, outre le manque de reproductibilité, est son niveau de résolution qui dépasse rarement 5 Mb.

7- La CGH microarray :

7-1 Introduction

Compte tenu des limites de résolution de la CGH (5–10Mb), tous les microremaniements ne peuvent pas être détectés par cette technique. Ceci est en particulier le cas des syndromes microdélétionnels connus qui, nous l'avons vu précédemment, sont générés par des microremaniements génomiques de l'ordre de 1–5 Mb.

La CGH microarray s'est développée sur la base de la CGH et des retombées du séquençage du génome humain [249].

7-2 Aspects techniques et limites de la CGH microarray

Afin d'augmenter la résolution, différentes équipes ont eu l'idée d'effectuer des CGH non pas sur des chromosomes mais sur des fragments d'ADN, dont l'ensemble représente une partie, voire la totalité du génome. Pour ce faire ils ont utilisé les chromosomes artificiels de bactéries (BAC) [250,251].

Un BAC correspond à un plasmide ayant des origines de réplifications des chromosomes bactériens et dans lequel a été inséré (cloné) une séquence d'ADN humain de l'ordre de 150 kilobases (kb). Chaque clone bactérien contient une séquence précise de notre génome. Une fois

introduit dans une bactérie, le plasmide se réplique un grand nombre de fois. Les cytogénéticiens ont utilisé ces BACs comme sondes pour la FISH. Dans le même temps les inserts humains contenus dans les clones bactériens ont été séquencés et grâce à un formidable travail informatique ont pu être ordonnés le long des chromosomes permettant de connaître la séquence de notre génome [252]. Contrairement à la CGH classique, où les deux ADN sont hybridés sur des métaphases, l'hybridation est réalisée ici sur un support où sont déposés, sous forme de spots, des fragments d'ADN génomique extraits généralement de BAC ou de PAC (chromosomes artificiels de Phage). Ce développement technologique, permettant d'analyser simultanément un grand nombre de séquences d'ADN génomique déposées sur un support appelé « puce » (chip) par analogie aux puces électroniques, a été appelé CGH microarray (ou CGH sur microréseaux). Elle nécessite essentiellement 3 composants : un support, en général des lames de verre, des sondes (fixées sur la lame) et des cibles (qui correspondent au matériel à étudier) [253].

Contrairement à la CGH sur chromosomes, le rapport de fluorescence n'est plus calculé selon l'axe de chromosomes mais au niveau de chaque dépôt correspondant au fragment d'ADN fixé. L'interprétation est de ce fait beaucoup plus rapide et automatisable. L'informatique joue un rôle central dans l'interprétation. Différents logiciels ont été développés permettant un traitement statistique des données et proposant une représentation graphique automatique des résultats (figure 7).

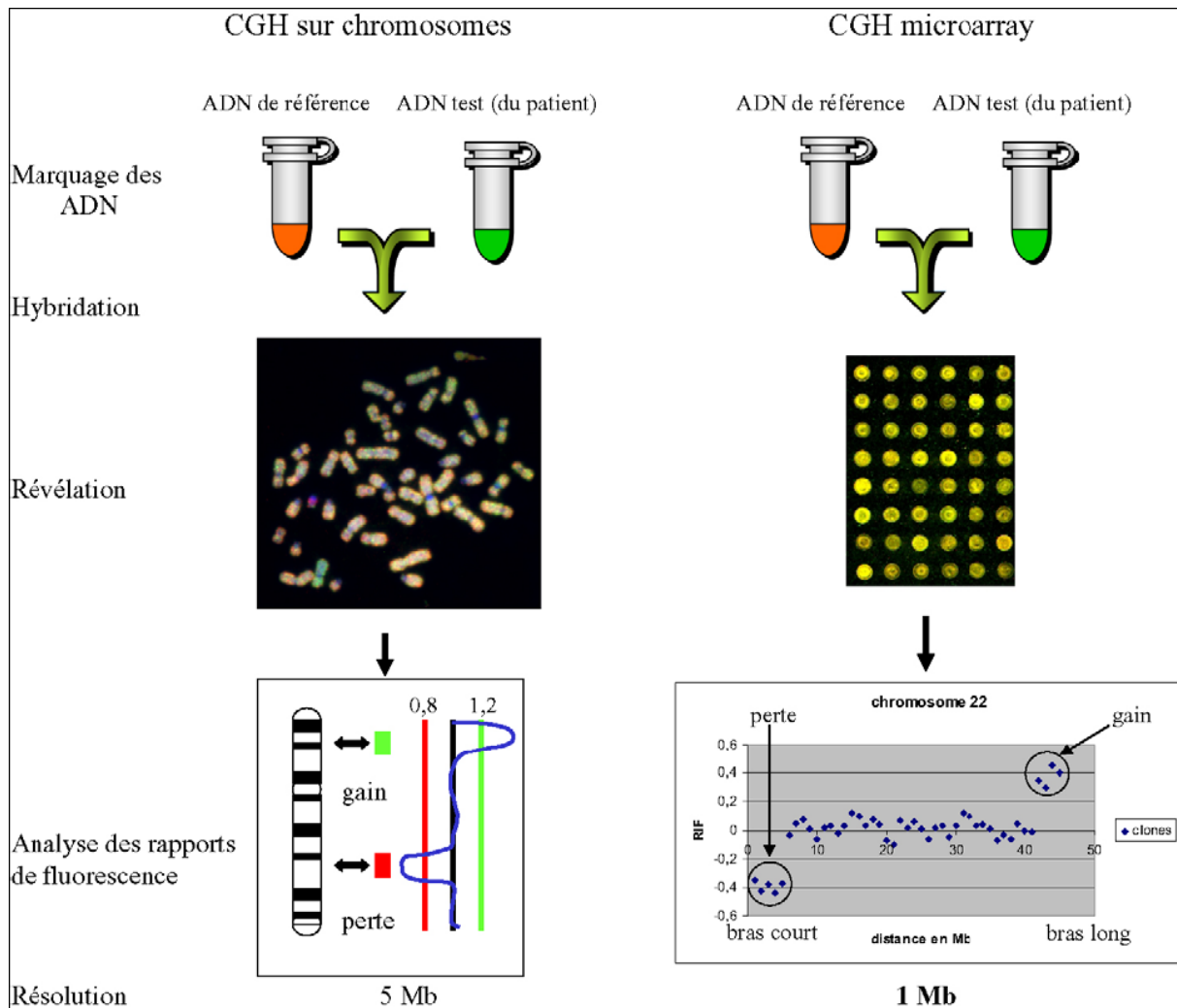


Figure 10 : Synoptique comparatif des principales étapes entre la CGH sur chromosomes à gauche et la CGH microarray à droite.

7-3 Les applications

De nombreux travaux ont validé cette technique dans l'exploration des déséquilibres génomiques en prénatal :

-détection de microremaniements

En 2002, Veltman a démontré l'efficacité de la CGH microarray dans la détection des remaniements subtélomériques [254].

En fonction des clones fixés sur la lame, la CGH microarray permet aussi de détecter des remaniements intercalaires. Le plus souvent, les puces utilisées comportent environ 3500 clones

offrant un niveau de résolution moyen de l'ordre d'une mégabase. L'utilisation de ce type de puce a permis, par exemple, de montrer 12 déséquilibres chromosomiques au sein d'une cohorte de 50 patients présentant un retard mental syndromique inexpliqué et pour lesquels le caryotype et l'analyse des extrémités subtélomériques en FISH n'avaient pas montré d'anomalie [25,256]. 7 délétions et 5 duplications intercalaires ont été détectées. Cependant, parmi les 5 duplications, 4 étaient héritées d'un des parents présentant par ailleurs un phénotype normal. Ce fait montre d'une part qu'il est difficile de faire un lien direct entre un déséquilibre chromosomique de petite taille, surtout une duplication, et le phénotype (d'où la nécessité d'étudier les parents) et, d'autre part a confirmé l'existence de polymorphismes.

-Caractérisation d'anomalies cytogénétiques

D'autres équipes ont utilisé cette technique pour définir des remaniements particuliers en construisant des puces en contig sur une région précise. Ainsi, dès 2003, Veltman et al. ont défini de façon très précise une région critique pour l'atrésie du conduit auditif externe chez les patients présentant une délétion du bras long du chromosome 18 [254].

Cette approche a été adoptée pour étudier d'autres régions comme les régions 1p [257] [258], 4p [259], 15q [260], 17p [261].

8- LA PCR quantitative :

8-1 Introduction

La QF-PCR (Quantitative Fluorescence- Polymérase Chain Réaction) est une technique de biologie moléculaire qui a été récemment introduite pour remédier aux inconvénients de la FISH dans la mise en évidence rapide et sensible des anomalies chromosomiques les plus courantes du fœtus [262]. Elle est réalisée principalement sur des prélèvements de liquide amniotique et permet, en 24-48 heures, de mettre en évidence de possibles aneuploïdies des chromosomes 21, 18, 13, X et Y. L'analyse est effectuée conjointement à l'analyse cytogénétique traditionnelle, basée sur la culture d'amniocytes et la détermination du caryotype.

Cependant, elle ne nécessite pas de prélèvement supplémentaire car elle est réalisée directement sur un petit aliquot (1 ml) de l'échantillon obtenu par amniocentèse. La rapidité d'exécution de la QF-PCR permet de réduire à un minimum les temps d'attente du résultat. La possibilité d'exclure une pathologie chromosomique dans les heures qui suivent le prélèvement contribue à soulager l'anxiété des parents; dans les cas positifs, l'obtention rapide du résultat permet aux parents de convenir avec leur médecin, bien à l'avance, d'une éventuelle intervention thérapeutique.

Cette technique innovante se distingue de la FISH prénatale (Fluorescent In Situ Hybridization) par le fait qu'elle est moins laborieuse, facilement automatisable et nettement moins coûteuse. En outre, certaines de ses particularités techniques permettent la détection de mosaïcismes, la détermination de la zygote dans les grossesses gémellaires, et l'identification rapide de la contamination maternelle, qui n'est pas réalisée par la FISH et le caryotype.

8-2 Aspects techniques

La méthode est basée sur l'amplification in vitro, par technique PCR, de séquences répétées d'ADN appelées microsatellites ou STR (Short Tandem Repeats), localisées sur les chromosomes considérés. Les fragments d'ADN amplifié marqués à la fluorescence sont ensuite séparés et quantifiés par électrophorèse capillaire couplée à un séquenceur automatique. Les STR sont des séquences hautement polymorphiques dont la longueur varie en fonction du nombre de répétitions de la séquence unitaire. Dans la majorité des cas, le tracé électrophorétique d'un STR d'un individu normal montre deux pics de surface et de hauteur égales, correspondant respectivement aux produits amplifiés de l'allèle maternel et de l'allèle paternel.

8-3 Avantages de la QF-PCR

Outre ses avantages de rapidité et de facilité d'exécution, la QF-PCR présente certaines caractéristiques qui, par rapport à la FISH prénatale, lui confèrent une solidité et une fiabilité supérieures. Il a été démontré que la présence de polymorphismes constitutionnels dans les régions chromosomiques cibles peut fausser le résultat de la FISH, dans la mesure où cette

technique utilise une seule sonde fluorescente par chromosome analysé. La QF-PCR est moins sensible à ce phénomène grâce à l'utilisation simultanée de plusieurs marqueurs par chromosome. De plus, dans la QF-PCR, l'évaluation quantitative d'un tracé électrophorétique est plus précise et moins sujette à interprétation qu'une FISH, basée sur le comptage manuel au microscope de signaux fluorescents. Cette précision permet à la QF-PCR l'identification rapide de mosaïcismes dans les cas où la lignée cellulaire trisomique est supérieure à 20% [263].

Les prélèvements de LA contaminés par des cellules de la mère représentent un gros problème dans la FISH prénatale, dans la mesure où il est impossible de distinguer les signaux dérivés de cellules fœtales de sexe féminin de celles de la mère. En revanche, dans la QF-PCR, la présence d'une contamination maternelle se reconnaît facilement, car sur le tracé électrophorétique vient s'ajouter, pour chaque STR, l'allèle maternel qui n'a pas été hérité par le fœtus. Les échantillons contaminés doivent toutefois être interprétés avec prudence, en analysant en parallèle un échantillon de sang de la mère.

Les avantages de cette technique sont l'extrême rapidité par rapport à la technique de PCR classique (30 minutes au lieu de 2 à 3 heures) avec un résultat immédiat et une sécurité quant aux risques possibles de contamination par de l'ADN exogène.

III. BIOCHIMIE PRENATALE :

1 – le dosage de l'αFP dans le LA :

L'αFP est essentielle au métabolisme fœtal, elle équivaut à l'albumine en période postnatale. Son interprétation nécessite l'établissement préalable de valeurs de références. Ce marqueur est très sensible mais peu spécifique et des accroissements sont observés dans un contexte inflammatoire. C'est pourquoi l'intérêt de ce dosage reste limité aux :

- DPN des syndromes néphrotiques en raison d'antécédents familiaux.
- anomalies échographiques du placenta et/ou des reins fœtaux évoquant un syndrome néphrotique.
- quelques cas particuliers d'αFP sérique maternelle élevée avec échographie normale.

Il n'y pas d'indication à réaliser ce dosage pour le diagnostic des défauts de fermeture du tube neural.

Seul l'électrophorèse des cholinestérases du LA doit être réalisée dans cette indication.

2 – Electrophorèse des cholinestérases du LA [264] :

C'est la technique de référence pour le diagnostic biochimique des anomalies de fermeture du tube neural. Il s'agit de malformations graves comprenant l'anencéphalie et la myéloméningocèle.

L'acétylcholinestérase est une enzyme spécifique du tissu nerveux. A l'état normal, elle n'existe pas dans le LA. Si le fœtus présente un DFN, l'enzyme neuronale soluble du LCR s'écoule dans le LA.

Cette iso enzyme est caractérisable par sa migration en gel de polyacrylamide ce qui permet de la différencier des autres isoformes normalement présents dans le LA. La présence de 2 bandes, une bande lente et une bande rapide, signe donc l'existence d'acétylcholinestérase et donc, la présence anormale de tissu nerveux ou de LCR dans le LA.

Cette technique est délicate, entièrement manuelle, non automatisable, mais elle permet un dosage qualitatif de grande sensibilité et spécificité.

Les indications sont :

- Suspicion de DFN
- Signes échographiques de malformation autre que celle du tube neural
- Examen systématique lors d'amniocentèse pour un caryotype

Il existe toutefois des données à prendre en compte :

- Un spina bifida fermé n'est pas biochimiquement détectable
- Il existe des faux positifs induits, en particulier, par une contamination par du sang fœtal.

3- Diagnostic de maladies métaboliques

Certaines maladies génétiques sont caractérisées par l'absence ou le caractère défectueux de l'enzyme normalement présente dans tous les tissus, y compris le trophoblaste et les cellules amniotiques. Il est alors possible d'effectuer un DPN par dosage d'activité enzymatique ou de substrat sur un échantillon de trophoblaste ou de LA.

Quand le risque est connu avant la grossesse, l'idéal est d'effectuer un diagnostic précoce sur prélèvement de trophoblaste, c'est le cas par exemple des maladies mitochondriales caractérisées par un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le DPN biochimique ne peut être proposé qu'aux familles dans lesquelles le déficit de la chaîne respiratoire a été mis en évidence dans les fibroblastes en culture du cas index (environ la moitié des patients). Dans ce cas, l'étude de la chaîne respiratoire sera réalisée sur villosités chorales entre 9 et 11 SA ou sur amniocytes à 16 SA. La mise en évidence d'un déficit de la chaîne respiratoire affirme la récurrence de la maladie. En revanche, un résultat normal n'exclut dans aucun cas la possibilité d'une expression ultérieure du déficit au cours de la grossesse ou même en période postnatale.

4- Enzymes digestives du LA :

Cette technique permet une approche indirecte de la fonction digestive au cours du développement. Celle-ci peut être altérée par des anomalies fonctionnelles (iléus méconial d'une mucoviscidose) ou anatomiques (atrésie intestinale).

Plusieurs enzymes digestives peuvent être dosées dans le LA. La phosphatase alcaline totale (PAL) est un mélange de 5 iso enzymes, dont l'iso enzyme digestive, GGTP, LAP et protéines totales. Une même activité de PAL totale peut donc à la fois correspondre à l'absence de l'isoenzyme digestive (très pathologique) ou à sa présence normale. En plus des isoenzymes de la PAL, d'autres enzymes digestives doivent être dosées, gammaglutamyl transpeptidase, leucine aminopeptidase et protéines totales.

Les indications d'étude des enzymes digestives dans le LA sont relativement peu fréquentes :

-Enzymes digestives et mucoviscidose :

Avant la découverte du gène CFTR, dont les mutations sont à l'origine de la mucoviscidose, on avait pu montrer la très haute fréquence d'une « obstruction intestinale fonctionnelle » chez les fœtus atteints. Cette obstruction se traduisait par l'effondrement des activités enzymatiques dans le LA.

Aujourd'hui, cette technique peut encore rendre service quand la génétique moléculaire ne permet pas de conclure, par exemple, quand il n'a pas été possible de déterminer les mutations responsables de la mucoviscidose chez un premier enfant atteint.

-Atrésie anorectale ou biliaire d'origine génétique :

Dans la situation exceptionnelle d'un antécédent de maladie génétique comportant une atrésie biliaire ou anale (inaccessible à l'échographie), on a pu réaliser un diagnostic prénatal fondé sur le dosage des enzymes digestives après amniocentèse.

-Contrôle de qualité des amniocentèses chez les jumeaux :

Quand les amniocentèses sont réalisées dans une grossesse gémellaire, il faut être certain d'avoir bien prélevé chacune des deux cavités amniotiques.

Des taux différents d'enzymes digestives dans les deux échantillons permettent d'affirmer qu'ils correspondent bien chacun à un jumeau différent.

5- Dosage de la bilirubine fœtale :

L'augmentation de la bilirubine du LA est l'une des conséquences biochimiques (liés à l'hémolyse) d'une allo-immunisation rhésus foetomaternelle (mère Rh- / fœtus Rh+). La

bilirubinémie permet de suivre la gravité de l'atteinte fœtale. Dans ce contexte le prélèvement de sang fœtal permet de préciser l'intensité de l'anémie fœtale par des paramètres hématologiques et d'envisager une ou plusieurs transfusions in utero. Généralement, l'amniocentèse s'effectue autour de la 18^{ème} semaine de grossesse. La découverte récente du gène rhésus permet de savoir plus tôt, par biologie moléculaire sur biopsie de trophoblaste ou sur ADN fœtal circulant dans le sang maternel, si l'enfant à naître est rhésus + ou - [265].

6- Biochimie rénale fœtale :

Une mention particulière mérite d'être faite sur l'intérêt majeur du dosage de la $\beta 2$ microglobuline dans les uropathies. Cette exploration biochimique de la fonction rénale fœtale est inutile lorsque l'échographie permet à elle seule de conclure. Parfois cependant, la confirmation biochimique de l'insuffisance rénale peut contribuer à asseoir le diagnostic et à conforter une décision d'abstention thérapeutique ou d'IMG.

Quand les données échographiques sont difficiles à interpréter, contradictoires ou évolutives, l'étude biochimique de la fonction rénale fœtale prend toute sa valeur. C'est le cas des dilatations urinaires évolutives, d'une échographie suspecte du parenchyme rénal ou d'une tendance à l'oligoamnios.

L'étude biochimique de l'urine fœtale, qui reflète surtout la fonction tubulaire, est l'approche la mieux évaluée. L'urine des 2 bassins ou, à défaut, du bassin du rein le moins atteint ou de la vessie est prélevée sous contrôle échographique.

De très nombreux composants ont été étudiés dans les urines. [2656] [267] [268].

Deux d'entre eux se sont révélés être les plus discriminants: le sodium et la $\beta 2$ microglobuline. Tous étudient la fonction tubulaire et jamais la fonction glomérulaire.

Schématiquement, l'élévation du sodium urinaire survient à un stade avancé et permet surtout de confirmer les données de l'échographie en faveur d'une atteinte grave de la fonction rénale.

L'élévation de la $\beta 2$ microglobuline urinaire fœtale est plus précoce et prédit de façon plus sensible que l'échographie le risque d'altération postnatale de la fonction rénale.

La β 2microglobuline sérique fœtale est le reflet de la fonction glomérulaire mais sa valeur pronostique n'a été étudiée que sur un nombre limité de cas [269].

IV– INFECTIOLOGIE PRENATALE :

Grâce à la biologie moléculaire [270], ce domaine a considérablement évolué, la plupart des maladies responsables d'embryofoetopathies sont diagnosticables in utero et certaines peuvent bénéficier d'un traitement.

1– La toxoplasmose :

Le diagnostic biologique ne repose plus dorénavant que sur la seule étude du liquide amniotique, le prélèvement étant réalisé à partir de la 18^e semaine et 4 semaines au minimum après la date présumée de l'infection maternelle.

Les performances de la recherche du génome toxoplasmique par PCR ont permis de se dispenser depuis plusieurs années de l'analyse du sang fœtal prélevé par cordocentèse.

En outre l'examen est rapide, le résultat pouvant être obtenu en quelques heures. Cependant, la valeur diagnostique de la PCR est dépendante des conditions techniques dans lesquels l'examen est réalisé, c'est à dire de la qualité du laboratoire.

Une recherche de toxoplasmose par inoculation à la souris est réalisée conjointement pour pallier les rares faux négatifs de la PCR [271].

2– Les infections virales :

2-1 Rubéole

Après la mise en évidence d'une séroconversion maternelle de rubéole, qu'il y ait contagé connu ou non, le DPN était anciennement réalisé sur un PSF à 22SA. Cette approche a pour inconvénient de donner un résultat très tardif au cours de la grossesse, alors que le risque d'atteinte fœtale grave est très élevé en cas de séroconversion précoce.

EN 1996 il a été possible de mettre en évidence le virus de la rubéole par RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) sur amniocentèse précoce, dès 13 –14SA. Mais ce test est plus délicat à

réaliser qu'une PCR classique car il s'agit d'un virus à ARN [272]. En cas de négativité du test cependant, un contrôle sur sang fœtal à 22SA reste prudent pour confirmer l'absence d'infection.

2-2 Varicelle

L'émergence de la biologie moléculaire avec les techniques de PCR a permis un progrès important dans le diagnostic de la varicelle congénitale. Dès 1991, l'application au dépistage est évoquée et montre une meilleure sensibilité que les cultures cellulaires. Le premier cas de diagnostic prénatal positif est rapporté en 1992.

Par ailleurs, le génome viral peut être retrouvé dans les lymphocytes maternels 3 à 10 semaines après la fin de l'éruption. L'analyse d'un liquide amniotique sanglant (contaminé par du sang maternel) peut alors entraîner un résultat faussement positif. Parmi 215 prélèvements de sang maternel réalisés avant amniocentèse et après cicatrisation des lésions cutanées maternelles, 10 % ont révélé une persistance du génome [273].

2-3 Parvovirus

Après séroconversion maternelle ou devant des signes évocateurs, le diagnostic de l'infection fœtale peut se faire de manières différentes :

–L'étude du LA permet la mise en évidence de l'ADN viral par PCR dont l'avantage réside encore une fois dans la spécificité et la rapidité de la réponse [274].

–L'étude de sang fœtal vient confirmer le diagnostic en constatant une anémie sévère arégénérative, la présence inconstante d'IgM sériques fœtales spécifiques, par la mise en évidence de l'ADN viral et par l'existence sur les précurseurs érythroïdes infectés d'anomalies caractéristiques d'une infection à parvovirus B19 : inclusions éosinophiles et margination de la chromatine.

2-4 Cytomégalovirus

La recherche de CMV sur LA est pratiquée après amniocentèse réalisée au moins 6 semaines après l'infection maternelle, et pas avant 22 SA. La recherche du génome du CMV par

PCR a les mêmes sensibilité et spécificité que la culture cellulaire. Il paraît prudent de conseiller la réalisation simultanée des deux techniques pour le DPN d'infection foetale à CMV, la PCR étant susceptible d'avoir une meilleure fiabilité en cas de problèmes de transport entre le lieu du prélèvement et le laboratoire.

Une équipe s'est intéressée au dosage des IgM anti Heat Shock protein 70 qui, d'une part, semble plus spécifique et plus sensible que la PCR et qui, d'autre part, peut être utilisé pour l'évaluation pronostique de l'infection [275].

CONSEQUENCES OBSTETRICALES ET PEDIATRIQUES DU DIAGNOSTIC PRENATAL

I– PRESENTATION GENERALE DES OPTIONS :

Dans une large mesure, prendre en charge un fœtus malade avant la naissance, c'est d'abord tenter de cerner le pronostic de son affection. En effet si les pathologies les plus graves peuvent déboucher sur une IMG, de nombreuses anomalies fœtales décelables en période prénatale sont au contraire curables et bénéficieront d'une prise en charge néonatale adaptée. Cette notion de gravité est cependant subjective. Elle dépend de l'expérience personnelle des familles, de leur perception de l'information médicale, et parfois de l'anxiété induite par le discours médical. C'est dire avec quel soin l'information devrait être délivrée en matière de DPN.

II– TRAITEMENTS IN UTERO :

1– Traitement de la pathologie rhésus :

La fréquence de cette affection a considérablement diminué depuis l'introduction en 1969 d'une prévention par l'administration de gamma globulines anti-D aux femmes Rhésus négatif après la naissance d'un enfant Rhésus positif et dans les autres situations obstétricales exposant à une immunisation (fausse couche, amniocentèse..). Elle est actuellement de 1‰ grossesses contre 1% il y'a 30 ans [275]. Le risque fœtal est apprécié au cours d'un bilan initial qui tient compte de la sévérité de l'atteinte éventuelle des enfants précédents, du diagnostic du groupe sanguin fœtal quand le père est hétérozygote (possible par étude de l'ADN fœtal dans le sang maternel) [276,277], et du dosage pondéral des anticorps (risque faible en dessous de 1 µg/ml).

Un traitement in utero est indiqué en cas d'anémie fœtale ($Hb < 8g /dl$ avant 32 SA et $<9g/dl$ après). Le traitement repose actuellement sur l'exsanguino transfusion in utero (ETIU) de sang rhésus négatif, après abord de la veine ombilicale près de son insertion placentaire.

La mère est mise sous traitement sédatif. Le volume des échanges est adapté au terme de la grossesse et poursuivi jusqu'à ce que l'hémoglobine soit remontée aux alentours de 14 à 15g/dl. Les ETIU sont répétées toutes les 3 semaines environ, jusqu'à obtention d'un terme correct pour la naissance.

Les résultats sont bons dans 95% des cas en l'absence d'anasarque et de 80% (contre 20% précédemment) si l'anasarque est constituée [278,279].

2- Pose de drains foeto-amniotiques

La reconnaissance de certaines pathologies obstructives fœtales permet d'envisager un geste de dérivation entre une cavité dilatée et l'espace amniotique dans le but d'éviter une détérioration de l'organe d'amont ou la pérennisation d'un anamnios. Ces pathologies doivent donc être connues dans leur histoire naturelle car elles sont associées à une morbidité et une mortalité importantes lorsqu'elles ne sont pas traitées in utero. A ce jour, seules 3 pathologies pourraient voir leur pronostic amélioré par le drainage :

- les uropathies obstructives basses ou bilatérales,
- la maladie kystique adénomatoïde du poumon de type macrokystique
- les épanchements pleuraux lorsqu'ils présentent des signes objectifs de compression et que la fonction d'organe sous-jacent semble encore normale.

L'information sur les risques et les limites du geste doit absolument être comprise des couples concernés. Ils doivent idéalement avoir eu un entretien préalable avec le pédiatre ou le chirurgien pédiatre qui prendra en charge l'enfant.

3- Traitements des infections fœtales :

3-1 toxoplasmose

Le traitement de la toxoplasmose a 2 objectifs :

-limiter le risque de transmission du parasite au fœtus, après séroconversion maternelle, en administrant de la spiramycine à la mère pour stériliser le placenta.

-traiter les fœtus infectés par le parasite avant que la parasitose n'ait induit des lésions irréversibles :

Compte tenu de sa lourdeur, de l'importance de ses éventuels effets secondaires et du fait qu'il peut négativer complètement les contrôles post nataux visant à documenter la réalité d'une infection congénitale, le traitement est réservé aux fœtus dont l'infection est confirmée par amniocentèse.

Les deux médicaments les plus utilisés sont la pyriméthamine (Malocid) et les sulfamides en particulier la sulfadiazine (adiazine). L'adjonction de sulfamides multiplie par 10 l'activité de la pyriméthamine, ce qui permet de l'utiliser à des doses non toxiques pour l'espèce humaine, ils sont donc prescrits en association [280].

L'efficacité de ces traitements in utéro a été démontrée dans les cas où l'infection maternelle est survenue relativement tard en cours de grossesse. Elle suppose une surveillance échographique très attentive durant toute la grossesse pour s'assurer de l'absence d'échec du traitement. En effet la survenue d'anomalies échographiques sévères, y compris au 3^{ème} trimestre, pourrait faire remettre en question le choix initial de poursuivre la grossesse.

3-2 Rubéole :

En cas d'infection entre 12 et 18 SA, l'IMG peut être discutée en fonction des données précises de chaque cas. Au delà de 18 SA, l'infection fœtale n'entraîne que des formes asymptomatiques et une simple surveillance post natale est proposée. Les nouveaux nés infectés sont porteurs du virus durant toute la 1^{ère} année dans les sécrétions pharyngées, les urines, les selles. Ils doivent être maintenus à distance des femmes enceintes séronégatives [281].

La vaccination s'impose en post partum immédiat chez les patientes séronégatives mais aussi dans les suites immédiates de fausses couches, IVG ou grossesses extra-utérines.

3-3 Cytomégalovirus

L'aspect échographique et son évolution au cours de la grossesse constituent le principal élément pronostique. L'apparition d'anomalies cérébrales, d'une anasarque et d'une hépatomégalie vont faire prévoir une infection congénitale symptomatique, avec son risque élevé de séquelles. En l'absence d'anomalies échographiques, des anomalies biologiques (thrombopénie, atteinte hépatique, détermination de la charge virale, taux d'anticorps) peuvent être recherchées par un PSF. Leur valeur pronostique n'est pas encore établie [282].

En présence d'anomalies échographiques, on est en mesure de donner aux parents des informations pronostiques, qui pourront le cas échéant conduire à la réalisation d'une IMG.

En l'absence de signes échographiques, cette évaluation pronostique n'est pas encore possible avec précision, rendant la prise de décision pratique extrêmement difficile. Certains professionnels recommandent la poursuite de la grossesse et le dépistage des troubles de l'audition en période néonatale et dans l'enfance. D'autres recommandent des investigations biologiques complémentaires recherchant une atteinte hématologique ou hépatique [282].

Certains couples demandent et obtiennent une IMG pratiquée « dans le doute », même si le risque d'interrompre la vie d'un enfant bien portant est élevé.

4-4 Parvovirus

En l'absence de traitement dans les formes à atteinte fœtale grave, la mort fœtale survient entre 4 et 6 semaines après la symptomatologie maternelle, mais peut se produire jusqu'à 12 semaines après.

Le PSF après avoir contribué au diagnostic, permet également de corriger l'anémie fœtale par transfusion in utero. Plusieurs auteurs ont rapporté des succès thérapeutiques aboutissant ainsi

à une guérison apparemment sans séquelles néonatales [283]. En cas d'infection maternelle, la plupart des auteurs recommandent la mise en place d'un suivi échographique régulier à la recherche des premiers signes d'Hydrops foetalis [283].

III. INTERRUPTION MEDICALE DE GROSSESSE (IMG):

En France, Une IMG peut être réalisée « quel que soit l'âge gestationnel si le fœtus est atteint d'une affection d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic ». L'IMG doit être demandée par la patiente, et l'indication doit être acceptée par 2 médecins appartenant à un centre multidisciplinaire de médecine fœtale.

1 – La technique du foeticide [284]

1-1 Le terme

En fonction des équipes ce geste est réalisé à partir de 20 ou 22 SA.

1-2 Le moment du foeticide :

Le foeticide a lieu idéalement le jour de l'expulsion pour éviter la macération rapide et la lyse neuronale rendant difficile l'examen foetopathologique.

La patiente est à jeûn, prémédiquée, et le geste a lieu au bloc opératoire ou en salle d'accouchement sous analgésie péridurale pour pouvoir enchaîner sur le déclenchement du travail ou bien sous anesthésie locale en cas de contre indication maternelle à l'analgésie péridurale.

1-3 Le geste :

On réalise un PSF au mieux au niveau de l'insertion funiculaire ou sur cordon libre, en cas de difficultés techniques ou d'abord impossible il reste la solution de l'abord intra cardiaque.

Les substances utilisées associent toujours un analgésique ou un anesthésique fœtal puis une substance lytique le plus souvent cardiotoxique entraînant des troubles du rythme cardiaque fœtal type tachycardie ventriculaire puis arrêt cardiaque.

ASPECTS ECONOMIQUES ETHIQUES
ET PSYCHOSOCIAUX DU DIAGNOSTIC
PRENATAL

I- ASPECTS ECONOMIQUES

1 -Critères du dépistage [285]

Le dépistage de masse est un protocole de santé publique qui repose sur des pré-requis d'ordre technique, sociologique, éthique, et économique. Il est réalisé à l'initiative des pouvoirs publics sur des populations de taille variable, bien définies quant aux critères d'éligibilité et s'avère régulièrement évalué. Le lancement d'une campagne de dépistage de masse repose sur la connaissance de critères en rapport avec la maladie à dépister, le test utilisé, l'efficacité et l'efficience du dépistage, les conditions d'exécution du programme.

1-1 Critères liés à l'affection

Le dépistage doit être limité à une affection soulevant un problème de santé publique de par sa morbidité et sa mortalité (tel que la T21). Son histoire naturelle doit être connue. La maladie doit être fréquente et curable au moment du diagnostic.

1-2 Critères liés au test de dépistage

Le test doit être simple, acceptable, non dangereux, non douloureux, non coûteux, fiable, reproductible. La validité du test est liée à sa capacité à identifier les sujets sains (test négatif) des sujets malades (test positif). La sensibilité du test est sa capacité à détecter les malades, alors que la spécificité est la capacité à repérer les sujets sains. Il existe néanmoins des faux négatifs et des faux positifs, d'où la notion de valeur prédictive positive qui exprime la proportion de malades parmi les sujets ayant un test positif.

1-3 Critères liés à l'efficacité et à l'efficience du dépistage

Le dépistage de masse doit comporter une obligation de résultat : réduire la morbidité et/ou la mortalité; néanmoins si le bénéfice collectif est important et immédiat, le bénéfice individuel est aléatoire et décalé dans le temps. Avant de lancer une campagne de dépistage pour une affection donnée, un essai randomisé doit avoir apporté la preuve de son efficacité.

2– Travaux d'évaluation économique

Les méthodes d'évaluation économique permettent d'évaluer les conséquences, en terme d'allocation de ressources et d'efficacité attendue, des préférences du décideur public en matière de définition de programmes de dépistage ou de diagnostic (analyse coût efficacité).

Dans ce cadre d'analyse s'inscrivent plusieurs travaux d'évaluation économique [286,287].

Ces travaux portent sur différentes activités de dépistage et de DPN, à titre d'exemple le dépistage de la T21 par dosage de MSM.

- Analyse économique du dépistage de la T21 fœtale par dosage de MMS [288] :

Le dépistage de la T21 par MSM a fait l'objet de nombreuses publications en matière d'évaluation économique, qui alimentent la réflexion sur les conditions de recours au DPN.

La portée des travaux d'évaluation économique du dépistage de la T21 fœtale est favorisée par la disponibilité de données précises sur les performances du dépistage par MSM, ainsi que sur la prévalence de la T21 fœtale par âge maternel et à différents moments de la grossesse.

Soulignons cependant que de grandes disparités sont observées quant à l'évaluation des coûts induits par la mise en œuvre des stratégies, ce qui invalide toute tentative de comparaison des résultats des études.

Les travaux économiques sur le dépistage de la T21 par dosage des MSM conduisent aux conclusions suivantes [289] :

–Préférer un dépistage généralisé à un dépistage ciblé sur critère d'âge maternel est davantage mobilisateur de ressources. Mais le maintien des décisions antérieures d'accès au DPN pour les femmes de 38 ans et plus conduit à un coût par cas supplémentaire dépisté qui est très supérieur au coût moyen par cas du dépistage généralisé.

–La possibilité de dépistage au 1^{er} et au 2^{ème} trimestre de grossesse ainsi que la diffusion du dépistage échographique de la T21 renouvellent les questions de définition de dépistage.

–L'adoption d'un critère de rentabilité, en termes de maximisation de la différence entre coûts de mise en œuvre et coûts évités attendus, conduit à envisager des valeurs seuils de risque pour la proposition du DPN qui sont inférieurs à 1/250 .

–Les performances du programme de dépistage et de DPN reposent in fine sur la décision de recours des femmes enceintes. Alors que quelques travaux portent sur l'analyse de la décision individuelle de recours au DPN, il n'existe pas de travaux d'économistes sur la décision individuelle de recours au dépistage, sur les préférences en matière de dépistage du 1^{er} et /ou du 2^{ème} trimestre, ainsi que sur l'impact de l'information sur la prise de décision.

II. ASPECTS PSYCHOLOGIQUES

1 – Circonstances du diagnostic :

L'indication « caryotype pour âge maternel » étant des plus anciennes, ses conséquences psychologiques ont été largement étudiées.

Alors que la situation est entrain de changer dans les pays où le dépistage par MSM est offert, la littérature montre que les femmes réagissent de manière différente selon la situation de DPN :

En effet, Green et Statham ont attiré l'attention sur le fait que les femmes recourant au DPN à cause de leur âge plus avancé expriment moins d'anxiété que celles qui recourent à cet examen suite à un résultat positif dans le cadre d'un dépistage systématique. La confrontation inattendue avec le résultat ainsi que le manque d'information avant le dépistage semblent influencer le niveau d'anxiété [290].

Soubieux a évalué l'impact du DPN de nuque épaisse sur le vécu de la grossesse. La façon d'annoncer la nouvelle et la manière d'envisager la problématique médicale ont un impact considérable sur les parents. Le médecin peut soit renforcer l'angoisse du couple et entraîner un effet déstructurant sur leur psychisme, soit les aider à se construire dans leur parentalité grâce à sa disponibilité, son écoute et son rôle de contenant, même dans ce contexte insécurisant.

Les travaux sur l'amniocentèse ont mis en évidence des résultats concordants et constants dans le temps :

- soucis vis-à-vis du risque potentiel d'avortement spontané
- nature stressante de la période d'attente des résultats
- réduction de l'anxiété dans les mois qui suivent la communication d'un bon résultat

Une étude de suivi a révélé qu'après une première amniocentèse, presque toutes les femmes ont eu une amniocentèse dans toutes leur grossesses ultérieures [291].

2- Annonce du diagnostic d'une maladie génétique :

L'annonce d'un diagnostic est toujours un moment délicat, mais particulièrement pour les maladies génétiques pour lesquelles les répercussions psychologiques peuvent être importantes :

–Pour le patient lui-même, qui peut être menacé dans son pronostic vital ou son autonomie fonctionnelle par le risque de voir se développer un handicap, sans possibilité de traitement curatif.

–Pour sa famille, lorsque la découverte de l'affection amène à annoncer que d'autres personnes ont un risque de la développer un jour ou de la transmettre à leurs enfants déjà nés ou à naître.

Cela est d'autant plus douloureux qu'il persiste encore dans certains esprits autour des maladies génétiques un tabou lié à la notion de tare familiale, terme qui n'a malheureusement pas encore disparu dans la bouche de certains médecins, auquel peut se surajouter un sentiment de culpabilité, parfois bien difficile à surmonter, pour le patient transmetteur. Il faut donc insister sur la nécessité d'un accompagnement prolongé du patient et sa famille [292].

Aux Etats-Unis, les auteurs insistent sur l'importance de développer des recommandations concernant le contenu des discussions entre les obstétriciens et les femmes enceintes. Les obstétriciens, les infirmières, les généticiens (genetic counselors) et les femmes enceintes doivent tous contribuer à l'élaboration de ces recommandations [293,294].

III. ASPECTS ETHIQUES :

Si le DPN appelle des interrogations au plan de l'éthique, c'est qu'il illustre parfaitement les ambiguïtés sociales et morales des progrès scientifiques que la réflexion éthique a pour tâche d'analyser. On considère généralement qu'un problème éthique surgit lorsqu'une personne ou un groupe est confronté à l'obligation d'agir alors que les cadres informatifs existants pour

guider sa décision ne lui semblent plus aller de soi. « Il y'a problème éthique quand une décision ne dépend pas des simples données objectives de la situation ou de son coût financier, mais des considérations juridiques, morales, idéologiques, religieuses ou même par des répugnances personnelles »[295]. L'introduction dans la pratique médicale du début des années 1970 de techniques de prélèvements et d'analyses de tissus fœtaux dans le but d'identifier une anomalie génétique grave a été reconnue d'emblée comme relevant de ce type d'interrogation.

1 – Modalités d'organisation du DPN :

Le DPN est un acte médical individuel. Il doit être accessible pour toutes les femmes qui le souhaitent. Cependant, il n'est ni obligatoire, ni systématique. Sa pratique pose de nombreux problèmes éthiques concernant la conduite à tenir devant une pathologie fœtale diagnostiquée en cours de grossesse, soit en raison d'antécédents, soit fortuitement, en fonction d'examens échographiques ou biologiques. Aussi, il est apparu indispensable qu'un encadrement législatif et réglementaire fixe à la fois les objectifs du DPN et les garanties d'une pratique de qualité :

– Une consultation médicale de conseil génétique doit précéder les prélèvements en vue d'établir un DPN. Le médecin délivre alors une attestation signée certifiant qu'il a correctement informé la patiente des bénéfices et risques.

– Le consentement éclairé de la femme enceinte est recueilli par écrit.

2 – Aspects légaux de l'IMG :

L'IMG pose de nombreux problèmes d'ordre éthique, juridique et religieux.

Les indications d'IMG légalement permises sont différentes suivant les pays. Des marges de manœuvres existent habituellement dans les possibilités d'application des textes législatifs et réglementaires. C'est pourquoi les médecins doivent appliquer les lois avec discernement.

2-1 - La loi française sur l'IMG [296]

Le code français de la santé publique autorise l'IMG dans 2 cas : soit en raison de la santé de la mère, soit en raison de la santé de l'enfant :

- La santé de la mère : l'IMG est permise lorsque « la poursuite de la grossesse met en péril grave la santé de la femme »

- La santé de l'enfant : l'IMG est permise quand il existe « une forte probabilité » qu'il existe une « affection d'une particulière gravité ».

En France depuis 1975, et plus récemment en Hollande ou au Royaume Uni, l'IMG peut être réalisée sans limitation de terme. Cette disposition légale peut paraître choquante à une époque où les progrès de la médecine néonatale font reculer les limites de la viabilité, parfois jusqu'au milieu du 2ème trimestre.

Concernant la décision de l'IMG, ni la femme ni le couple ne peuvent décider seuls du recours à une IMG, à la différence de l'IVG, ce qui donne à l'avis et à la décision médicale tout son poids. Le motif thérapeutique doit être attestée par deux médecins, après examen et discussion.

2-2- La loi marocaine sur l'IMG [297]

La loi marocaine sur l'avortement a évolué :

Elle autorisait les IMG quand la vie de la mère était en danger, actuellement la loi autorise les interruptions de grossesse quand la santé de la mère est en danger.

Cette modification a permis d'élargir l'éventail des indications d'IMG au Maroc. Les IMG pour pathologie rénale en constituent un exemple. La grossesse peut aggraver la pathologie de la mère mais sans engager le pronostic vital maternel dans un court terme. Il existe un vide juridique au Maroc concernant les IMG pour cause fœtale.

Du point de vue religieux, la question de l'interruption de grossesse en Islam n'a pas été évoquée de façon explicite par le Coran et les Hadiths. En fait les juristes musulmans ont eu recours à des efforts de réflexion « lidjtihad » pour statuer sur les différents aspects de la question. Des avis ont été formulés à la suite de recherches sur les multiples cas de figures pouvant se présenter. On parle de possibilité d'avortement avant que « la vie ne soit insufflée dans le fœtus ». Mais cette notion « d'âme insufflée au fœtus » est perçue différemment selon les théologiens musulmans. Pour certains l'âme est insufflée au fœtus dès la fécondation. Pour d'autres le fœtus commence à avoir une âme 40 jours après la fécondation.

Selon Chaouki Abdessahi, dans son ouvrage « la pensée islamique et les problèmes médicaux contemporains », le débat sur l'IMG reste ouvert. L'évolution de la médecine et de la science ne permet pas d'instaurer des lois figées. Les indications litigieuses d'IMG doivent être discutées

au cas par cas au conseil comprenant un théologien chercheur, le médecin de l'intéressé, un médecin spécialiste assermenté et d'autres personnes selon le cas.

3– Enjeux éthiques :

Les principaux enjeux éthiques sous-jacents à l'ensemble des pratiques du DPN n'ont guère changé depuis l'introduction de l'amniocentèse, malgré l'augmentation notable des techniques disponibles et des maladies pouvant être détectées avant la naissance. Ils concernent notamment [298] :

- le statut du fœtus et sa relation avec la mère,
- l'extension du DPN et le respect dû aux handicapés : ici le questionnement implique la société et fait intervenir des considérations sur la qualité de la vie, le sens social du handicap, le coût pour la famille et la société de la prise en charge des handicapés,
- l'avortement sélectif pour anomalie fœtale et l'aspect moral de la médecine en tant qu'activité sociale,
- le rôle du médecin à l'égard de la personne qui consulte : jusqu'où peut-il, doit-il, accepter que les parents exercent leur autonomie de décision ?

PERSPECTIVES D'AVENIR

Le diagnostic de certitude des aberrations chromosomiques et le DPN en général, nécessitent, comme nous venons de le voir, des techniques invasives comportant un risque fœtal, mais aussi maternel. Ces gestes diagnostiques sont parfois de réalisation difficile, de plus il existe une limite quant au terme de leur réalisation. Pour toutes ces raisons un DPN n'est donc proposé que dans les cas où le bénéfice est supérieur au risque lié au geste.

La recherche s'est donc orientée vers de nouvelles méthodes d'obtention de matériel fœtal comme l'identification et l'isolement de cellules susceptibles de circuler dans le sang maternel et plus récemment la découverte de l'ADN fœtal libre circulant dans le sérum maternel. La révolution s'effectue également dans l'approche du diagnostic avec le DPI.

I. PRESENCE DE CELLULES FŒTALES DANS LE SANG MATERNEL

1 – Historique :

Les 1ers indices de l'existence de cellules fœtales nucléées dans le sang périphérique maternel remontent à plus d'un siècle par l'observation au microscope de fragments cytoplasmiques multinucléés, considérés comme étant d'origine placentaire, dans les vaisseaux pulmonaires de femmes mortes d'éclampsie [299]. Les 1ères études cytogénétiques ont été menées en 1969 par Walknowska qui a mis en évidence des cellules présentant un caryotype 46 XY chez des femmes enceintes d'un enfant de sexe masculin [300]. Au début des années 1990, l'apparition de techniques sophistiquées de biologie moléculaire comme la PCR et la FISH a permis l'essor de ce domaine de recherche.

2 – Isolement de cellules fœtales :

Au cours de la grossesse, des érythrocytes fœtaux anucléés (globules rouges) peuvent traverser la barrière placentaire et être responsables d'une allo immunisation Rhésus maternelle. Ces cellules sont mises en évidence par le test de Kleihauer. Toutefois, ces cellules étant dépourvues de noyaux, elles ne peuvent pas être utilisées pour la réalisation d'un DPN non invasif de maladies génétiques et/ou chromosomiques. En revanche, les cellules

trophoblastiques, les érythroblastes, les lymphocytes et les cellules souches, nucléées, possèdent un matériel génétique théoriquement exploitable.

Les érythroblastes sont les meilleurs candidats pour plusieurs raisons :

- Demi-vie courte (5 jours) [301].
- Production et passage maternel précoce 6 SA [302].
- ils présentent des antigènes (glycophorine A, CD36, CD 71) [303] [304] permettant de les identifier et de les isoler des cellules plus matures (non nucléées).

Le taux de cellules foetales circulantes est très faible, entre 1 /106 et 1/108 au début de la gestation [305] et jusqu'à approximativement 1/104 en fin de grossesse [306]. Ce taux peut augmenter considérablement en cas d'aneuploïdie [307,308,309]

Quoi qu'il en soit, un enrichissement est souvent nécessaire préalablement au diagnostic [310,311]

3- Culture des cellules fœtales :

La mise au point de la culture de cellules foetales est une des voies de recherche majeure pour le DPN sur sang maternel [312,313]. Ce procédé basé sur l'utilisation d'un milieu de culture spécifique (hormones, facteurs de croissance), afin de favoriser la croissance des cellules foetales, permet d'envisager l'établissement du caryotype sur chromosomes en métaphase ou l'analyse directe des cellules après culture sans tri préalable.

Limites des cellules fœtales :

Quelque soit la méthode utilisée, aucune étude n'a une puissance statistique suffisante pour évaluer ces techniques. Un seul essai clinique a été réalisé aux Etats-Unis (le National Institutes of Health Fetal Cell Study (NIFTY)) [314] pour évaluer la pertinence du diagnostic prénatal des anomalies chromosomiques à partir des cellules fœtales circulantes. Les résultats montrent que les techniques utilisées placent ces investigateurs encore loin du but fixé : le développement d'une technique uniforme et reproductible qui permette de récupérer une population suffisante de cellules à partir d'un prélèvement maternel pour permettre des études moléculaires et/ou de cytogénétique.

De nombreuses équipes se sont penchées alors sur une autre source de matériel génétique fœtal circulant dans le sang maternel : L'ADN fœtal « libre » circulant.

PRESENCE D'ADN FOËTAL LIBRE DANS LE SANG MATERNEL :

Physiopathologie :

Plus récemment, la présence d'ADN fœtal libre (non cellulaire) circulant dans le plasma maternel a été mise en évidence [315]. L'origine de cet ADN fœtal reste encore une énigme. Il semblerait que le placenta en soit la source essentielle [316].

L'équipe de Dumez a complété ces données en montrant que l'ADN foetal peut être détecté dès le 18^{ème} jour de grossesse pour certaines patientes, et pour la majorité d'entre elles au 28^{ème} jour [317]. Enfin, l'ADN foetal ne persiste pas dans la circulation maternelle contrairement à certaines cellules foetales, et son analyse n'est donc pas faussée par des grossesses antérieures.

Techniques d'extraction :

L'analyse de l'ADN foetal dans le sang maternel s'affranchit des problèmes d'isolement et d'enrichissement, préalables à l'étude des cellules foetales. Elle est ici directe et relativement simple puisqu'elle ne requiert qu'une « simple » extraction des acides nucléiques à partir du sang maternel. La technique de choix pour l'analyse est indiscutablement aujourd'hui l'amplification génique par PCR en temps réel. Associée à des procédés automatiques d'extraction des acides nucléiques [318], la PCR en temps réel a une fiabilité jamais égalée par les méthodes conventionnelles.

Limites :

L'étude de l'ADN fœtal libre circulant a un champ d'application limité pour plusieurs raisons : D'une part il s'agit d'un ADN « en solution » qui n'est pas contenu dans un noyau cellulaire (cell_free DNA). Par conséquent, aucune analyse chromosomique (caryotype fœtal) n'est réalisable. D'autre part, cet ADN fœtal est dilué au sein d'un ADN largement majoritaire et

hautement homologue qu'est l'ADN libre circulant d'origine maternelle. Il est donc très difficile de distinguer la contribution maternelle de l'ADN fœtal circulant dans le sérum maternel.

Applications diagnostiques :

Pour les raisons évoquées précédemment, les possibilités diagnostiques sont actuellement limitées. Les deux principales applications actuelles de l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sérum maternel sont, d'une part, la détermination du sexe fœtal [319] et, d'autre part, le génotypage Rhésus fœtal [320]. Les implications médicales de ces deux diagnostics sont importantes. Elles vont permettre dans le 1^{er} cas de modifier radicalement la prise en charge du DPN des maladies liées au chromosome X ou celles dont la prise en charge est modifiée selon le sexe du fœtus (hyperplasie congénitale des surrénales par ex) [321]. Dans le 2^{ème} cas, elles vont permettre d'adapter la prise en charge des patientes Rhésus négatives allo immunisées, et de celles confrontées à des situations obstétricales à risque [322] (interruption de grossesse, procédure invasive...).

LE DIAGNOSTIC PREIMPLANTATOIRE (figure 11) :

Définition :

Le DPI consiste à réaliser une analyse génétique sur des embryons humains obtenus par fécondation in vitro (FIV) et à ne transférer chez la patiente que des embryons sains ou porteurs sains [323]. Cette méthode anténatale de diagnostic génétique permet d'éviter l'épreuve d'une IMG à un couple à risque élevé de transmettre une maladie génétique [324].

Indications [325]:

Le DPI s'adresse aux :

- couples à risque de transmettre une maladie génétique et qui ne souhaitent pas recourir au diagnostic prénatal classique pour plusieurs raisons :
 - Opposition morale ou religieuse à l'interruption médicale de grossesse

- Expérience douloureuse d'interruptions de grossesse répétées après diagnostic prénatal

- Risque génétique pour lequel un diagnostic précis n'est pas encore possible mais pour lequel le transfert d'embryons non atteints est une option. C'est le cas de certaines maladies liées à l'X.

- couples présentant une hypofertilité justifiant en soi une fécondation in vitro et chez qui un risque génétique a été identifié :

- Infertilité due à un mosaïcisme gonadique, une translocation chromosomique ou à un âge avancé.

- Couples à risque pour une maladie monogénique et nécessitant une fécondation in vitro.

Avantages et limites :

Le principal avantage du DPI est qu'il permet d'éviter une interruption de la grossesse. Cela constitue la principale motivation de la majorité des couples faisant appel à lui. En général, ces couples ont déjà un enfant atteint et connaissent bien les conséquences de la maladie. En outre, un grand nombre a déjà subi l'expérience malheureuse d'une interruption de grossesse.

Par ailleurs, au moins trois facteurs peuvent être responsables d'une erreur de diagnostic : l'absence d'amplification d'un des allèles, la contamination par de l'ADN masculin et la présence d'une mosaïque chromosomique.

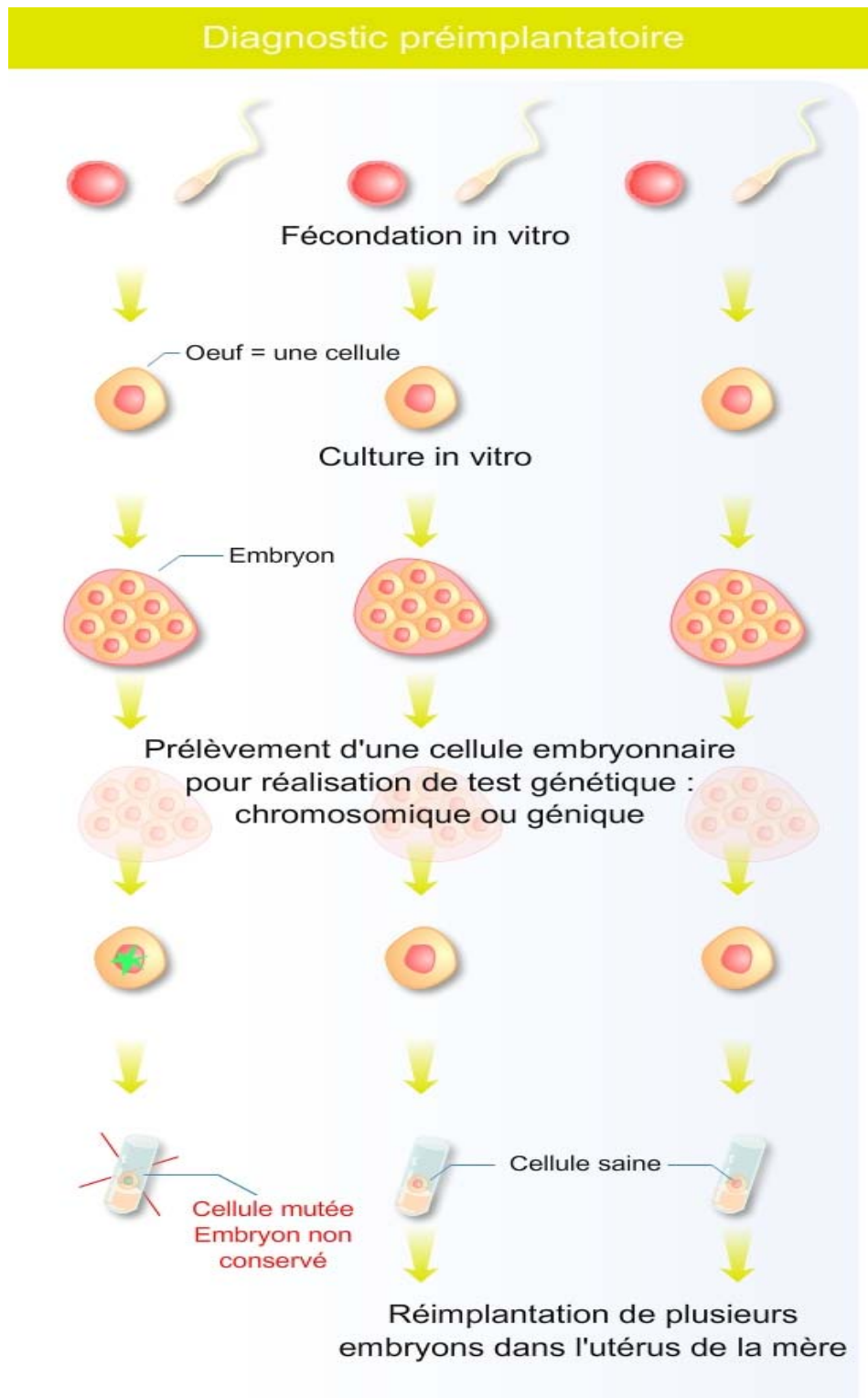


Figure 11 : principe du DPI

CONCLUSION

Le diagnostic prénatal constitue l'avancée la plus médiatisée de nos jours. Il permet de porter in utero le diagnostic de pathologies fœtales graves.

Les prélèvements et gestes interventionnels réalisables sur le fœtus in utero ont permis de passer d'une médecine anténatale purement diagnostique à une médecine thérapeutique.

Les pathologies pouvant justifier un DPN sont les anomalies chromosomiques, les maladies géniques et les embryofetopathies infectieuses. Le dépistage des anomalies chromosomiques consiste à cibler des patientes à risque chez lesquelles un prélèvement invasif pour caryotype fœtal est réalisé. La multiplicité des outils de dépistage rend nécessaire l'intégration de leurs résultats dans un même calcul de risque, pour ne pas multiplier inutilement les gestes invasifs.

Ces gestes sont :

- L'amniocentèse (prélèvement de liquide amniotique), méthode la plus couramment réalisée, à partir de 15–16 semaines.
- La choriocentèse (prélèvement de villosités choriales), à partir de 11–12 semaines.
- La cordocentèse (prélèvement de sang fœtal), à partir de 20–22 semaines.

Ces gestes ne peuvent se scinder d'un accompagnement du couple dans le difficile parcours du choix d'une technique invasive dont le rapport entre les bénéfices attendus et les risques doivent toujours être rappelés et expliqués.

Les progrès réalisés en matière de dépistage des anomalies chromosomiques au 1^{er} trimestre par la mesure de la clarté nucale et les marqueurs sériques maternels imposent de disposer d'un outil diagnostique tout aussi précoce et fiable, au prix d'un risque acceptable : la biopsie de trophoblaste est la technique de choix.

Au niveau des techniques biologiques, l'application de la cytogénétique moléculaire au DPN a permis aujourd'hui de faire des diagnostics rapides d'aneuploïdie sur liquide amniotique et de reconnaître des microdélétions suspectées sur un signe d'appel échographique.

Le diagnostic prénatal par analyse de cellules ou d'ADN du fœtus dans le sang maternel est devenu une réalité, dès aujourd'hui utilisable pour le diagnostic de sexe dans les maladies liées à l'X. Le diagnostic préimplantatoire, récemment autorisé en France, se développe rapidement.

Au plan des thérapeutiques, le syndrome transfuseur transfusé est exemplaire, deux interventions prénatales : l'amniodrainage et la coagulation des anastomoses au laser, ayant radicalement amélioré son pronostic.

Toutes ces transformations ont eu de considérables conséquences éthiques, économiques, sociales et juridiques, dont les médias se font régulièrement écho.

Au Maroc, il existe un vide juridique concernant le DPN et par là, nombre d'incertitudes persistent sur sa pratique actuelle. Il semble qu'un débat à ce niveau soit nécessaire, il devrait permettre de définir avec précision les indications et les limites du DPN.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Young ID, Rickett AB, Clarke M.** Genetic analysis of malformations causing perinatal mortality. *J Med Genet* 1986;23:58–63.
- [2] **Costa T, Scriver CR, Childs B.** The effect of Mendelian disease on human health: a measurement. *Am J Med Genet* 1985 Jun 21;(2):231–242.
- [3] **Boog G., Goujard J., Levi S., levy G., Pierre F.** Dépistage des malformations foetales. *J.E.M.U.*, 1997, 2,122–138
- [4] **Hahnemann JM, Vejerslev LO.** Quality guidelines and standards for genetic laboratories / clinics in prenatal diagnosis on fetal samples obtained by invasive procedures. *Eur J Human Genet* 1997b; 5: 342–50
- [5] **R.Levy, J.-S. Arfi, F.Daffos.** Techniques de prélèvements fœtaux. *EMC–Gynécologie Obstétrique* 2 (2005) 144–150.
- [6] **Chen CP, Chen SR, Wang W.** Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. *Prenat Diagn* 2000; 20:355–7.
- [7] **Braude P, Pickering S, Flinter F, Mackie Ogilvie C.** Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet* 2002; 3:941–53.
- [8] **Hook EB.** Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and mortality. *Cytogenet Cell Genet* 1982; 33: 101–106.
- [9] **Hook EB, Hamerton JL.** The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies– differences between studies: results by sex and severity of phenotypic involvement. *Population cytogenetics studies in humans*. New York: Academy Press, 1977: 63–79.
- [10] **Cornel MC and the EUROCAT working group.** Variation in prenatal cytogenetic diagnosis: policies in 13 european countries 1989–1991. *Prenat Diagn* 1994; 14:337–44
- [11] **Reid M.** The diffusion of four prenatal screening tests across Europe. *King's Fund Centre*, 1991, 134 p.
- [12] **Antonarakis S.E., Avramopoulos D., Blouin J.-L., Talbot C.C., Schinzel A.A.,** Mitotics errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4,5% of cases and are not associated with advanced maternal age. *Nature Genet.*, 1993, 3, 146–150.

- [13] **Bricker L., Garcia J., Henderson J., Mugford M., Neilson J., Roberts T., Martin A.M.** Ultrasound screening in pregnancy : a systematic review of clinical effectiveness and women's views. *Health Technol. Assessm.* 2000; 4: 1 – 193.
- [14] **4. Muller F., Dreux S., Rebiffé M., Faïna S., Mandin V., Detaverneir C.** Marqueurs sériques maternels de la trisomie 21 foetale au 2ème trimestre de la grossesse. *La revue du praticien Gynécologie Obstétrique.* 2002 ; 64 : 25 – 9.
- [15] **Snijders RJM, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH.** UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Lancet* 1998;351:343–6.
- [16] **Hook EB.** Down syndrome. frequency in human populations and factors pertinent to variation in rates. Dans: de la Cruz FF, Gerald PS, rédacteurs. *Trisomy 21 (Down syndrome): research perspectives.* Baltimore: University Park, 1981, p. 3–18.
- [17] **Coulson CC, Katz VL, Kuller JA.** Triple-marker screening for aneuploidy. Dans : Kuller JA, et al, rédacteurs. *Prenatal diagnosis and reproductive genetics.* St-Louis (MO): Mosby; 1966; p. 84–95.
- [18] **Bissegio TR, Morris TS.** An outcomes analysis of five prenatal screening strategies for trisomy 21 in women younger than 35 years. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar;190(3):721–9
- [19] **Dar H, Merksamer R, Berdichevsky D, David M.** Maternal serum markers levels in consecutive pregnancies: a possible genetic pre-disposition to abnormal levels. *Am J Med Genet* 1996;61:154–7.
- [20] **Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG.** Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:387–402.
- [21] **Cuckle HS, Wald NJ.** Screening for Down's syndrome. Dans: Lilford RJ, rédacteur. *Prenatal diagnosis and prognosis.* London: Butter-worths; 1990; p. 67–92.
- [22] **Norton ME.** Biochemical and ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Semin Perinatol* 1994; 18:256–65.

- [23] **Leschot NJ, Vejerslev LO.** Proceedings of the EUCROMIC Workshop on prenatal diagnosis. Eur J Hum Genet 1997;5(Suppl 1):1–6.
- [24] **American College of Obstetricians and Gynecologists, Committee on Obstetric practice.** Down syndrome screening. N° 141. Int J Gy–necol Obstet 1994;47:186–90.
- [25] **Collège canadien de généticiens médicaux (CCMG).** Cytogenetics Committee. CCMG Guidelines: Clinical indications for cytoge–netic investigation – 1997.
- [26] **Morris JK, Mutton DE, Alberman E.** Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down’s syndrome. J Med Screen 2002; 9(1):2–6.
- [27] **Vyas S.** Screening for Down's syndrome. Ignorance abounds. BMJ 1994; 309:753–4.
- [28] **Little B,B., Ramin S.M., Cambridge B.S, Schneider N.R.** Risks of chromosomal abnormalities with emphasis on live–born offspring of youngmothers. Am. J. Hum.Genet., 1995, 57, 1178–1185.
- [29] **Griffin D.K., Abruzzo M.A., Millie E.A.** Non disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. Hum. Mole. Genet., 1995, 4, 12, 2227–2232.
- [30] **Benn PA., Egan F.,** Reproducibility of risk figures in 2nd–trimester maternal serum screening for down syndrome: comparison of 2 laboratories.Clin Chem. 2006 Nov;52(11):2087–94. .
- [31] **Fang M, Egan JF.** Trends in the use of second trimester maternal serum screening from 1991 to2003.GenetMed.2005May–Jun;7(5):328–31.
- [32] **Palomaki GE, Knight GJ, McCarthy JE, Haddow JE, Donhowe. JM.** 1997. Maternal serum screening for Down syndrome in the United States: a 1995 survey. Am J Obstet Gynecol 176: 1046–51.
- [33] **Cannick JA. Mac raeJR.** Second trimester serum markers.Semin Perinatol. 2005 Aug;29(4):203–8.
- [34] **Wald N, Huang. M.** Triploidy identified through second–trimester serum screening. Prenat Diagn. 2005 Mar;25(3):229–33.
- [35] **Lambert JM., Raphtis Cs., Byberg K.,** Apparently low maternal serum inhibin A levels in second–trimester screening. Prenat Diagn. 2005 Oct;25(10):967–8.

- [36] **Tul N., Adventalik Z.** Serum PAPP-A levels at 10–14 weeks of gestation are altered in women after assisted conception. *Prenat Diagn.* 2006 Dec;26(13):1206–11
- [37] **Spencer K., Nicolaides KH.** Second-trimester levels of pregnancy-associated plasma protein-A and free beta-hCG in pregnancies with trisomy 13. *Prenat Diagn.* 2005 May;25(5):358–61.
- [38] **Spencer K., Souter V., Tul N., Snijders R., Nicolaides K.H.** A screening program for trisomy 21. 10 – 14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 1999 ; 13 238 – 241.
- [39] **Brizot M.L., Snijders J.M., Bersinger N.A., Kuhn P., Nicolaides K.H.** Maternal serum PAPP-A and fetal nuchal translucency thickness for the prediction of fetal trisomies in early pregnancy. *Obstet. Gynaecol.* 1994; 6: 918–922.
- [40] **Hurley P.A., Ward R.H.T.** Serum PAPP-A measurements in first-trimester screening for Down syndrome. *Prenat. diag.* 2000; 13: 903 – 8
- [41] **Wald M.H., Pandian M.R..** Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat. Diag.* 1997; 7: 623– 30.
- [42] **Macri J.N., Kasturi R.V., Krantz D.A.** Maternal serum Down's syndrome screening : free beta protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990;163: 1248–53.
- [43] **Cuckle H., Nicolaides KH., Spencer K.** Down syndrome screening marker levels in women with a previous aneuploidy pregnancy. *Prenat Diagn.* 2005 Jan;25(1):47–50
- [44] **Muller F, Forestier F, Dineon B.** Second trimester trisomy 21 maternal serum marker screening. Results of a countrywide study of 854,902 patients. *Prenat Diagn* 2002;22:925–9.
- [45] **Kramer RL, Yaron Y.** Effect of adjustment of maternal serum alpha-fetoprotein levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med Genet* 1998;75:176–8.
- [46] **O'Brien JE, Dvorin E, Drugan A, Johnson MP, Yaron Y, Evans MI.** Race-ethnicity-specific variation in multiple marker biochemical screening: alpha-fetoprotein, hCG, and estriol. *Obstet Gynecol* 1997; 89:355–8.

- [47] **Muller F, Bussieres L, Pelissier MC, Oury JF, Boue C, Uzan S.** Do racial differences exist in second-trimester maternal hCG levels? A study of 23369 patients. *Prenat Diagn* 1994;14:633-6.
- [48] **Spencer K.** The influence of smoking on maternal serum AFP and free beta hCG levels and the impact on screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 1998; 18:225-34.
- [49] **Wald NJ, Watt HC.** Serum markers for Down's syndrome in relation to number of previous births and maternal age. *Prenat Diagn* 1996; 16:699-703.
- [50] **Spencer K, Salonen R, Muller F.** Down's syndrome screening in multiple pregnancies using alpha-fetoprotein and free beta hCG. *Prenat Diagn* 1994;14:537-42.
- [51] **Muller F, Dreux S, Uzan S, Oury JF.** Second-trimester Down syndrome maternal serum screening in twin pregnancies: impact of chorionicity. *Prenat Diagn* 2003;23:331-5.
- [52] **Bronshtein M, Jakobi P, Ofir C.** Multiple fetal intracardiac echogenic foci: not always a benign sonographic findings. *Prenat Diagn* 1996 Feb ;16(2) :131-5.
- [53] **Szabo J, gellen J.** Nuchal fluid accumulation in trisomy-21 detected by vaginosography in first trimester. *Lancet* 1990 Nov 3 ;336(8723) :1133.
- [54] **Borrell A, Costa D, Martinez JM, Delgado RD, Farguell T, Fortuny A.** Criteria for fetal nuchal thickness cut-off: a re-evaluation. *Prenat Diagn* 1997(b) Jan; 17(1): 23-9.
- [55] **Snidjers RJM, Sebire NJ, Nicolaides KH.** Increased nuchal translucency in trisomy 13 fetuses at 10-14 weeks of gestation. *Am J Med Genet* 1999 Sep 17;86(3) :205-7.
- [56] **Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K.** Fetal nuchal translucency : ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *Br Med J* 1992(b) Apr 4 ;304(6831) :867-9.
- [57] **Paul C, Krampl E, Skentou C, Jurkovic D, Nicolaides KH.** Measurement of fetal nuchal translucency thickness by three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001 Nov;18(5):481-4.
- [58] **Nicolaides KH, Shawwa J, Brizot M, Snidjers R.** Ultrasonographically detectable markers of fetal nuchal translucency at 11-14. *Prenat Diagn* 2002 Apr ;22(4) :308-15.
- [59] **Y.Ville, Schaefer M, Lauriichesse-Delmas H.** The effect of nuchal cord on nuchal translucency measurement. *Br J Obstet Gyneacol* 1998;11: 271-3

- [60] **Chitty LS, Pandya PP.** Ultrasound screening for fetal abnormalities in the first trimester. *Prenat Diagn* 1997 Dec;17(13):1269–81.
- [61] **Brizot ML, Snijders RJM, Bersinger NA, et al.** Maternal serum pregnancy-associated plasma protein A and fetal nuchal translucency thickness for the prediction of fetal trisomies in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1994;84:918–22.
- [62] **Nicolaides KH.** Nuchal translucency and other first trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:45–67.
- [63] **Goetzl L., Krantz D., Simpson J., Pergament E.** Pregnancy-associated plasma protein A, free beta-hCG, nuchal translucency, and risk of pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 2004 Jul;104(1):30–6.
- [64] **Cicero S., Sacchini S., Nicolaides KH.** Sonographic markers of fetal aneuploidy, a review. *Placenta.* 2003 Oct; 24 Suppl B:S88–98.
- [65] **J.Goujard.** La mesure de la clarté nucale et le dosage des marqueurs sériques commencent-ils à modifier l'incidence de la trisomie 21. *Gynécologie Obstétrique Fertilité* 32 (2004) 496–51
- [66] **Pinson L., Morry F.Herry A.** Characterisation of supernumerary chromosomal markers: a study of 13 cases. *Cytogenet Genome Res.* 2007;116(1–2):18–23.
- [67] **Gardner R.J.M., Sutherland G.R.** Chromosomes abnormalities and genetic counseling. Oxford monographic medical genetics 17. Oxford University Press, Oxford, 1989.
- [68] **Daniel A., Hook E.B., Wulf G.** Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangement: data from United States and Canadian laboratories. *Am. J. Med. Genet.*, 1989, 33, 14, 14–53.
- [69] **Nicolaides KH, Snidjers RJ, Campbell S.** Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet* 1992(a) Sep 19; 340(8821): 704–7.
- [70] **Nicolaides KH.** Screening for fetal chromosomal abnormalities: need to change the rules. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994 Sep; 4(5): 353–4.
- [71] **Fong KW, Toi A, Salem S, Keating SJ, et al.** Detection of fetal structural abnormalities with US during early pregnancy. *Radiographics* 2004; 24:157–74.
- [72] **Carvalho JS.** Fetal Heart scanning in the first trimester. *Prenat Diagn* 2004;24:1060–7.

- [73] **Shipp T.D., Benacerraf B.R.** Second trimester ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Prenat. Diagn.* 2002; 22: 296 – 307.
- [74] **Smith-Bindman R, Deeks JJ, Goldberg JD.** Second-trimester ultrasound to detect fetuses with Down syndrome. A meta-analysis. *JAMA*, vol. 285, 2001, p. 1044-55.
- [75] **Crandall BF., Chua C.** Detecting neural tube defects by amniocentesis between 11 and 15 weeks' gestation. *Prenat Diagn.* 2000 Apr;15(4):339-43
- [76] **Loft AG.** Immunochemical determination of amniotic fluid acetylcholinesterase in the antenatal diagnosis of open neural tube defects. *Dan Med Bull* 1995; 42:54-70.
- [77] **Pilu G, Falco P, Gabrielli S, Perolo A, Sandri F, Bovicelli L.** The clinical significance of fetal isolated cerebral borderline ventriculomegaly: report of 31 cases and review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol*, vol. 14, 1999, p. 320-6.
- [78] **Tomlinson MW, Bottoms SF.** Isolated mild ventriculomegaly: associated karyotypic abnormalities and in utero observations », *J Matern Fetal Med*, vol. 6, 1997, p. 241-4.
- [79] **Launay S, Robet Y, Valat AS, Thomas D, Devisme L, Rocourt N et coll.** Cerebral fetal MRI and ventriculomegaly, *J Radiol*, vol. 83, n° 6 (partie 1), 2002, p. 723-30.
- [80] **Rosati P, Guariglia L.** Cerebellar hypoplasia : could it be a sonographic finding in abnormal fetal karyotype in early pregnancy? *Fetal Diagn Ther* 1999 Nov-Dec; 14(6): 365-7.
- [81] **Snidjers R.J.M., Nicolaides K.H.** Ultrasound markers for fetal chromosomal defects. 1996. The parthenon Publishing Group. London.
- [82] **Bromley B, Doubilet P, Frigoletto F, Krauss C, Estroff J, Benacerraf B.** Is fetal hyperechoic bowel on second trimester sonogram an indication for amniocentesis, *Obstet Gyneacol*, vol. 83, 1994, p. 647-51.
- [83] **Winter TC, Anderson AM.** Echogenic intracardiac focus in 2nd-trimester fetuses with trisomy 21: usefulness as a US marker. *Radiology*, vol. 216, n° 2, 2000, p. 450-6.
- [84] **Wax JR, Mather J, Chen C, Aponte-Garcia A, Steinfeld JD, Ingardia CJ.** A preliminary study of sonographic grading of fetal intracardiac echogenic foci: feasibility, reliability and association with aneuploidy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000 Aug ;16(2):123-7.

- [85] **Smith–Bindmann R, Feldstein VA, Goldberg JD.** The genetic sonogram in screening for Down syndrome. *J Ultrasound Med* 2001 Nov ;20(11) : 1153–5.
- [86] **Vintzielos AM, Campbell WA, Guzman ER, Smulian JC, McLean DA, Ananth CV,** Second-trimester ultrasound markers for detection of trisomy 21 : which markers are best ? *Obstet Gynecol* 1997 Jun; 89(6):941–4.
- [87] **Bromley B, Shipp T, Benacerraf BR.** Genetic sonogram scoring index: accuracy and clinical utility. *J ultrasound Med* 1999 Aug; 18(8):523–8.
- [88] **Viora E, Errante G, Bastonero S, Sciarrone A, Campogrande M.** Minor sonographic signs of trisomy 21 at 15–20 weeks' gestation in fetuses born without malformations: a prospective study. *Prenat Diagn* 2001 Dec ; 21(13) : 1163–6.
- [89] **Bahado–Singh R, Shahabi S, Karaca M, Mahonney MJ, Cole L, Oz UA.** The comprehensive midtrimester test. *Am J Obstet Gynecol* 2002 Apr ; 186(4) : 803–8.
- [90] **Benacerraf BR.** The second trimester fetus with Down syndrome : detection using sonographic features. *Utrasound Obstet Gynecol* 1996 Feb; 7(2): 147–55.
- [91] **bromley B, Lieberman E, Benacerraf BR.** The incorporation of maternal age into the sonographic scoing index for the detection at 14–20 weeks of fetus with Down's syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997 Nov; 10(5): 321–4.
- [92] **Vintzileos A.M., Guzmann E.R., Smulian J.C., Ananth C.V.** Choice of second trimester genetic sonogram for detection of trisomy 21. *Obstet. Gynecol.* 1997; 90 (2): 187 – 90.
- [93] **Liu SC, Jarolim P, Rubin HL, Hassan K, et al.** The homozygous state for the band 3 protein mutation in Southeast Asian ovalocytosis may be lethal. *Blood* 1994;**84**:3590–359.
- [94] **M. Kassis, F.Galacteros, C.Ferec, M.Delpech.** Place du conseil génétique en médecine fœtale. *EMC–Pédiatrie* 2(2005) 116–150.
- [95] **Nau JY.** Prenatal testing for cystic fibrosis. *Rev Med Suisse.* 2006 Sep 27;2(80):2204.
- [96] **Palomaki GE.** Prenatal screening for cystic fibrosis: an early report card. *Genet Med.* 2004 May–Jun;6(3):115–6.

- [97] Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: diagnosis algorithms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: Mc Graw-Hill; 2003.
- [98] Smits A, Smeets D, Hamel B, Dreesen J, de Haan A, van Oost B. Prediction of mental status in carriers of the fragile X mutation using Cgg repeat length. *Am J Med Genet* 1994;51:497-500.
- [99] Russo S, Selicorni A, Bedeschi MF, Natacci F, Viziello P, Fortuna R, et al. Molecular characterization of Fraxepositive subjects with mental impairment in two unrelated families. *Am J Med Genet* 1998; 75:304-308.
- [100] Ancelle T, Goulet V, Tirard-Fleury V, Baril L, Du Mazaubrun C, Thulliez P, Wcislo M, Carme B. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995, Résultats d'une enquête nationale périnatale. *B.E.H* 1996; 51:227-8.
- [101] Pratlong F, Boulot P, Villena J, Issert E, Tamby I, Cazenave J, Dedet JP. Antenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of the biological parameters in a cohort of 286 patients. *Br. J. Obstet. Gynaecol* Jun, 1996;103 (6):552-7.
- [102] Forestier F, Hohlfeld P, Sole Y, Daffos F. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR :extended experience. *Prenat Diagn* 1998; 18:407-9.
- [103] Daffos F, Mirlesse V, Hohlfeld P, Jacquemard F, Thulliez P, Forestier F. Toxoplasmosis in pregnancy. *Lancet* 1994;344-541.
- [104] Romand S, Jacquemard F, Nobre R, Thulliez P. Toxoplasmose et grossesse. *Méd Thér Pédiatr* 1998;1:481-488.
- [105] Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* 2001;97:296-300.
- [106] Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *Br Med J* 1999; 318:1511-1514.
- [107] Yow MD. Congenital cytomegalovirus disease: a now problem. *J Infect Dis* 1989; 159 : 163-167.
- [108] Lynch L, Daffos F, Emanuel D, Giovangrandi Y, Meisel R, Forestier F, et al.

Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 1991;**165**:714–718.

[109] **Lombardi G., Stronati M.** Congenital cytomegalovirus infection. *Minerva Pediatr.* 2005 Oct;**57**(5):213–27.

[110] **Revello MG, Gerna G.** Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002;**4**:680–715.

[111] **Nigro G, Mazzocco M, Anceschi MM, La Torre R, Antonelli G, Cosmi EV.**

Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection after primary or recurrent maternal infection. *Obstet Gynecol* 1999 ; **94** : 909–914.

[112] **Best JM.** Rubella vaccines: past, present and future. *Epidemiol Infect* 1991;**107**:17–30.

[113] **Grangeot-Keros L.** Virus de la rubéole. Les virus transmissibles de la mère à l'enfant Médecine Science. Paris: John Libbey Eurotext; 1999.

[114] **Marret H, Golfier F, Di Maio M, Champion F, Attia-Sobol J, Raudrant D.**

Rubella in pregnancy. Management and prevention. *Presse Méd* 1999 ; **28** : 2117–2122.

[115] **Tang JW, Aarons E, Hesketh LM, Strobel S, Schalasta G, Jauniaux E, et al.**

Prenatal diagnosis of congenital rubella infection in the second trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2003; **6**:509–12.

[116] **Enders G, Jonatha W.** Prenatal diagnosis of intrauterine rubella. *Infection* 1987 ; **15** : 162–164.

[117] **Enders G, Miller E, Bolley I, Ridehalgh M.** Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: prospective study of 1739 cases. *Lancet* 1994;**343**:1548–51.

[118] **Stegmann BJ, Carey JC.** TORCH Infections. Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella–zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. *Curr Womens Health Rep* 2002;**2**: 253–8.

[119] **Hohlfeld P, Champion F, Rebaud A, Folfier F, Raudrant D.** La ponction de sang fœtal est-elle justifiée pour le diagnostic intra-utérin de la varicelle congénitale? *Mkd Fetale Echo Gynecol* 1994;**20**:22

[120] **Miller E, Fairley CK, Cohen BJ, Seng C.** Immediate and long-term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1998;**105**:174–178.

[121] Rodis JF, Quinn DL, Gary W, Anderson LJ, Rosengren S, Cartter ML, et al.

Management and outcomes of pregnancies complicated by human B19 parvovirus infection: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163: 1168–117.

[122] Rodis JF, Rodner C, Hansen AA, Borgida AF, Deoliveira I, Shulman Rosengren S. Management of parvovirus infection in pregnancy and outcomes of hydrops : a survey of members of the Society of Perinatal Obstetricians. *Am J Obstet Gynecol* 1998 ; 179 :985–8. **[123]**

Schild RL, Bald R, Plath H, Eis–Hubinger AM, Enders G, Hansmann.

M. Intrauterine management of fetal parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13:161–6.

[124] Codaccioni X, Vaast P, Therby D, Baalbaky I, Puech F. Physiologie et pathologie du liquide amniotique. In : M. Tournaire, Mises à jour en gynécologie et obstétrique 1990, 197–232.

[125] Thoulon J–M, P Arnould, S Bretones. Techniques des prélèvements ovulaires pour diagnostic prénatal. EMC 1997. 5–015–C–10.

[126] Miyake H., Nakai A., Shimada A. Effect of first–trimester ultrasound examination for chromosomal aberrations in women undergoing amniocentesis. *J Nippon Med Sch.* 2006 Oct;73(5):271–6.

[127] Canadian early mid–trimester amniocentesis trial (Cemat) group. Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *Lancet* 1998;351:242–7.

[128] Nyberg DA., Johnson JA., Souter V. Hyatt J. First–trimester screening. *Radiol Clin North Am.* 2006 Nov;44(6):837–61

[129] Delamare C, Carbonne B, Uzan S et al. Detection of hepatitis C virus in amniotic fluid : a prospective study. *J Hepatol* 1999; 31:416–20.

[130] Mandelbrot L, Mayaux MJ, Bongain A. et al. Obstetric factors and mother–to–child transmission of human immunodeficiency virus type 1 : the french perinatal cohorts. *Ann. J. Obstet. Gynecol.*, 1996, 175, 661–667.

[133] Bravo R, Shulman L, Philips O. Transplacental needle passage in early amniocentesis and fetal loss. *Obstet Gynecol* 1995 ; 86 ; 437–440.

- [134] Shalev E, Weiner E, Yana N, Shneur Y, Cohen H. Comparison of first trimester transvaginal amniocentesis with chorionic villus sampling and mid-trimester amniocentesis. *Prenat Diagnosis* 1994 ; 14 ; 279–283.
- [135] Marthin T, Liedgren S, Hammar M. Transplacental needle passage and other risk-factors associated with second trimester amniocentesis, *Ada Obstet Gynecol Scand*, vol. 76, 2003, p. 728–32.
- [136] Fung Kee Fung K, Crane J, Armson A, De la Ronde S, Farine D et Can, coll. Directives cliniques de la SOCG. Prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle Rh, *J Obstet gynecol* vol.25, n 9,2003,p.765–73.
- [137] Squier M, Zaiwalla Z, Ansow P, Oxburt J, Goult S, et al. Five cases of brain injury following amniocentesis in mid-term pregnancy. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42:554–60.
- [138] Borrelli AL., Cobelli L., Di domenico A. Fetal and maternal amniocentesis complications *Minerva Ginecol.* 2006 Oct;58(5):423–7
- [139] Diaz Vega M, Lacueva P-D., Leal C. Early amniocentesis at 10–12 weeks' gestation. *Prenat. Diagn.*, 1996, 16, 307–312.
- [140] Patil S, Fatem C, Moore J, Grant S, Williamson R. Early gestationnel amniocentesis for cytogenetic studies. *Vouliagmeni–Athens*, 1988:40–41.
- [141] Elejalde BR, Elejalde MM, Acuna JM, Thelen D, Trujillo C, Karrmann M. Prospective study of the amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation : its feasibility, risks, complications and use in early genetic prenatal diagnosis. *Am J Med genet* 1990; 35:188–96.
- [142] Stripparo L, Buscaglia M, Longatti L. Genetic amniocentesis: 505 cases performed before the sixteenth week of gestation. *Prenat diagn* 1990; 10:359–364.
- [143] Nevin J, Nevin NC, Dornan JC, Armstrong MJ. Early amniocentesis :experience of 222 consecutive patients, 1987 1988. *Prenat diagn* 1990; 10: 79–83.
- [144] Hanson FW, Tennant F, Hune S, Broohyser K. Early amniocentesis :outcome, risks, and technical problems at 12 weeks. *Am J Obstet gynecol* 1992; 166:1707–1711.
- [145] Kerber S, Held K. Early genetic amniocentesis–4 years'experience. *Prenat Diagn* 1993; 1:21–27.

- [146] **Buscaglia M, Molteni F, Ghisoni L.** Standard amniocentesis versus early amniocentesis: a multicentric experience. *Prenat Diagn* 1992; 12(suppl): S56.
- [147] **Rousseau O, Boulot P, Nagy P, et al.** Amniocentèse avant 15 SA. *Job Gynecol* 1993 ;1 : 256–263.
- [148] **Philipp J., Silver RK., Wilson RD., Thom EA., Zachary JM., Mohide P., Mahoney MJ.** Late first-trimester invasive prenatal diagnosis: results of an international randomized trial. *Obstet Gynecol.* 2004 Jun;103(6):1164-73.
- [149] **Sahin FI., Ilmaz Z., Ozap O.** Prenatal diagnosis of mosaicism identified in amniotic fluid cell cultures. *Genet Couns.* 2006;17(3):341–8.
- [150] **Firth H.V.** Chorion villus sampling and limbs deficiency : cause or coincidence ? *Prenat Diagn.*, 1997, 17, 1313–1330.
- [151] **Lansac.** *Obstétrique pour le Praticien.* 2000. Ed Masson.
- [152] **Body G, F Perrotin, P Deschamps.** *Les prélèvements fœtaux : techniques et complications.* Ed Masson.
- [153] **Ahmed S.** Transabdominal chorionic villus sampling (CVS) for prenatal diagnosis of genetic disorders. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2006 Mar;16(3):204–7
- [154] **Wapner J.** Invasive prenatal diagnostic techniques. *Semin Perinatol.* 2005 Dec;29(6):401–4
- [155] **Wilson RD, Cho K, McGillivray B, Kalousek D, Shaw D, Baldwin V.** Chorionic villus sampling; analysis of fetal losses to delivery, placental pathology and cervical microbiology. *Prenat Diagn*, vol. 11, 1991, p. 539–50.
- [156] **Brambati B, Lanzani A, Tului L.** Transabdominal and transcervical chorionic villus sampling: efficiency and risk evaluation of 2,411 cases. *Am J Med Genet*, vol.35, 1990, p. 160–4.
- [157] **Shime J, Benzie R, Mohide P, Wilson D, Natale R, Johnson J.** Canadian multicenter randomized clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis: detailed obstetrical procedures and results », *Prenat Diagn*, vol. 12, 1992, p. 411–22.
- [158] **Wilson RD.** Chorionic villus sampling: a risk benefit breakdown », *Can J Diagn*, vol. 13, n° 2, 1996, p. 43–61.

- [159] **Cleary goldamn J., D'alton ME.** Prenatal diagnosis and multiple pregnancy. *Semin Perinatol.* 2005 Oct;29(5):312–20
- [160] **Fiddler M, Frederickson MC, Chen PX, Pergament E.** Assessment of fetal status in multiple gestation pregnancies using interphase FISH. *Prenat Diagn.* 2001 Mar; 21(3):196–9.
- [161] **De Catte L, Liebaers I, Foulon W, Bonduelle M, Van Assche E.** Firsttrimester chorionic villus sampling in twin gestations. *Am J Perinatol*, vol. 13, 1996, p. 413–7.
- [162] **Brambati B., Tului L., Cislighi C., Alberti E.** First 10000 chorionic villus samplings by a singleton operator. *Prenat. Diagn.*, 1998, 18, 255–266.
- [163] **Emslie JB., Connors S.** Association of Clinical Cytogeneticists chorion villus sampling database 1987–2000. *Prenat Diagn.* 2006 May;26(5):420–7.
- [164] **Ledbetter DH.** Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 1992 ; 51 : 451–6.
- [165] **Grati FR, Grimi B, Frascoli G, Di Meco AM, Liuti R, Milani S, Trotta A, Dulcetti F, Grosso E, Miozzo M, Maggi F, Simoni G.** Confirmation of mosaicism and uniparental disomy in amniocytes, after detection of mosaic chromosome abnormalities, in chorionic villi. *Eur J Hum Genet.* 2006 Mar;14(3):282–8.
- [166] **Kotzot.d.** Maternal uniparental disomy 14 dissection of the phenotype with respect to rare autosomal recessively inherited traits, trisomy mosaicism, and genomic imprinting. *Ann Genet.* 2004 Jul–Sep; 47(3): 251–60.
- [167] **Kalousek DK, Langlois S, Yam I, Wilson DR, Howard–Peebles PN et coll.** Uniparental disomy for chromosome 16 in humans », *Am J Hum Genet*, vol. 52, 1993, p. 8–16.
- [168] **Kennerknecht I, Barbi G, Wolf M, Djalali M, Grab D, Terinde R, Vogel W.** Cytogenetic diagnoses after chorionic villus sampling are less reliable in very–high or very–low–risk pregnancies. *Prenatal diagnosis* 1993, 13 : 929–44.
- [169] **Valenti C.** Antenatal detection of hemoglobinopathies. A preliminary report. *Am J Obstet Gynecol.* 1973 Mar 15;115(6):851–3.
- [170] **Hobbins JC, Maonney J.** In utero diagnosis of hemoglobinopathies. Technic for obtaining fetal blood. *N Engl J Med.* 1974 May 9; 290(19):1065–7.

- [171] **Henrion R, Dumez Y, Dubuisson JB, Goosens M, Dubart A, Beuzard Y.** Fetal blood sampling. *Nouv Presse Med.* 1979 Dec 17;8(49):4023–6.
- [172] **Rodeck CH, Campbell S.** Sampling pure fetal blood by fetoscopy in second trimester of pregnancy. *Br Med J.* 1978 Sep 9;2(6139):728–30.
- [173] **Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F.** Fetal blood sampling via the umbilical cord using a needle guided by ultrasound. Report of 66 cases. *Prenat Diagn* 1983;3: 271–277.
- [174] **Can Liao, Jiaxue Wei, Qiuming Li, Lixian Li, Dongzhi Li.** Efficacy and safety of cordocentesis for prenatal diagnosis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2006 93, 13–7.
- [175] **Nicolini U, Nicolaidis P, Fisk NM, Tannirandon Y, Rodeck CH.** Fetal blood sampling from the intrahepatic vein: analysis of safety and clinical experience with 214 procedures. *Obstet Gynecol* 1990;76:47–53.
- [176] **Abdelfatah SA., Bartha JL., Kyle PM., Denbow ML.** Safety of fetal blood sampling by cordocentesis in fetuses with single umbilical arteries. *Prenat Diagn.* 2004 Aug;24(8):605–8.
- [177] **Tongsong T, Wanapirak C, Kunavikantikul C, Sirirachotiayakul S.** Cordocentesis at 16–24 weeks of gestation: experience of 1320 cases. *Prenat Diagn* 2000;20:224–8.
- [178] **Muller F, Dommergues M, Mandelbort L, Aubry MC, Nihoul-Fekete C, Dumez Y.** Fetal urinary biochemistry predicts postnatal renal function in children with bilateral obstructive uropathies. *Obstet gynecol* 1993; 82:813–820.
- [179] **Holbrook KA, Smith LT, Elias S.** Prenatal diagnosis of genetic skin disease using fetal skin biopsy samples. *Arch Dermatol* 1993; 129:1437–54.
- [180] **Romero R, Munoz H, Gomez R et coll.** Two-thirds of spontaneous abortion/fetal deaths after genetic midtrimester amniocentesis are the result of a pre-existing subclinical inflammatory process of the amniotic cavity, *Am J Obstet Gynecol*, vol. 172, 1995, p. 261.
- [181] **Wenstrom KD, Andrews WW, Tamura T, Du Bard MB, Johnston KE, Hemstreet GP.** « Elevated amniotic fluid interleukin-6 levels at genetic amniocentesis predict subsequent pregnancy loss », *Am J Obstet Gynecol*, vol. 175, 1996, p. 830–3.
- [182] **Fray RE, Davis TP, Brown EA.** *Clostridium welchii* infection after amniocentesis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984 ; vol 288 : 901–2.

- [183] **Body G, F Perrotin, P Deschamps.** Les prélèvements fœtaux : techniques et complications. Ed Masson.
- [184] **Strippao L., buscaglia M., Longatti L.** Genetic amniocentesis : 505 cases performed before the sixteenth week of gestation. *Prenat. Diagn.*, 1990, 10, 359–364.
- [185] **Tongsong T, Wanapirak C, Sirivatanapa P, Piyamongkol W, Sirichotiyakul S, Yampochai A.** Amniocentesis–related fetal loss : a cohort study. *Obstet Gynecol* 1998 Jul ;92(1) :64–7.
- [186] **Eddleman K, Berkowitz R, Kharbutli Y, Malone F, Viddaver J, Flint Porter T et coll.** « Pregnancy loss rates after mid trimester amniocentesis : the FASTER trial », *Am J Obstet Gynecol*, vol. 189, n6, 2003, S111.
- [187] **Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, Dukes K, Berkowitz RL, Kharbutli Y, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, Saade GR, Klugman S, Dugoff L, Craigo SD:** Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol.* 2006 Nov;108(5):1067–72.
- [188] **MRC (Medical Research Council) Working party.** An assesement of the hazards of amniocentesis. *Br J Obstet Gynecol* 1978 ;85 (suppl 2) :1–41.
- [189] **Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB.** Randomized controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low–risk woman. *Lancet* 1986;1: 1287–1293.
- [190] **Simpson JL, Mills JL, Holmes LB, Ober CL, Aarons J, Jovanovic L, et al.** Fetal loss rates after ultrasound–proved viability in early pregnancy. *JAMA* 1987; 258:2555–57.
- [191] **Merin S, Beyth Y.** Uniocular congenital blindness as a complication of midtrimester amniocentesis. *Am J Ophtalmol.*1980, vol 89: 299–301.
- [192] **Lamb MP.** Gangrene of a fetal limb due to amniocentesis. *Br J Obstet Gynecol.* 1975, vol 82: 829–830.
- [193] **Sundberg K., Bang J., Smidt–Jensen S., Brocks V., Lundsteen C., Parner J et coll .,** Randomised study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionic villus sampling. *Lancet*, 1997, 350, 697–703.
- [194] **Vago T, Chaukin J.** Extramembraneous pregnancy : anusual complication of amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1980 ;137 :511–512.

- [195] **Ashkenazy M, Borenstein R, Katz Z, Segal M.** Constriction of the umbilical cord by an amniotic band after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol Scand* 1982;61: 89–91.
- [196] **Gilberg C., Rasmussen P., Wahlstroem J.** Long term follow-up of children born after amniocentesis. *Clin.Genet.*, 1982, 21, 69–73.
- [197] **Winsor EJ, Tomkins DJ, Fan YS et coll.** Cytogenetic aspects of the Canadian early and mid-trimester amniotic fluid trial (CEMAT) , *Prenat Diagn*, vol. 19, 1999, p. 620–7.
- [198] **Brambati B, Oldrini A.** Chorionic villus sampling : an analysis of the obstetric experience of 1000 case, *Prenat Diagn*, 1987,7, 157.
- [199] **shulman L.P., Meyers C.M., Simpson J.-L, Andersen R., Tolley E.A., Elias S.**
Foeto-maternal transfusion depends on amount of chorionic villi aspirated but not on method of chorionic villus sampling. *Am. J. Obstet Gynecol.*, 1990, 162, 1185–1188.
- [200] **Moise K.J., Carpenter R.J.** Increased severity of fetal hemolytic disease with known rhesus alloimmunization after first-trimester trans-cervical chorionic villus biopsy. *Fetal Diagn. Ther.*, 1990, 5, 76–78.
- [201] **Baumann P, Jovanovic V.** Risk of miscarriage after transcervical and transabdominal CVS in relation to bacterial colonisation of the cervix, *Prenat Diagn.*, 1991, 11, 551–557.
- [202] **Ammala P, Hiilesmaa VK, Liukkonen S, Saisto T, Teramo K, von Koskull H.**
Randomized trial comparing first-trimester transcervical chorionic villus sampling and second-trimester amniocentesis *Prenat Diagn*. 1993 Oct; 13(10):919–2.
- [203] **Cohen Overbeek T.E, Hop W.C, Jahoda M.G.** Spontaneous abortion rate and advanced maternal age : consequences for prenatal diagnosis. *Lancet*, 1990, 336,27–29.
- [204] **Leticee N.** How to perform... a chorionic villus sampling. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006 Mar;34(3):263–6.
- [205] **Firth H.V., Boyd P.A., Chamberlain P., Mackensie I.Z., Lindenbaum R.H., Huson S.M.** Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56–66 days gestation. *Lancet* 1991, 337, 762–63.
- [206] **Burton B.K. Schulz C.J., Burd L.I.** Limb anomalies associated with chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol*. 1992, 79, 726–730.

- [207] **Mastroiacovo P., Botto L.D., Cavalcanti D.P., Lalatta F., Selicorni A., Tozzi A.E., et coll.**, Limb anomalies following chorionic villus sampling : a registry based case-control study. *Am. J. Med. Genet.*, 1992, 44, 856-864.
- [208] **Froster UG, Jackson L.** Limb defects and chorionic villus sampling: results from an international registry, 1992-94. *Lancet*, vol. 347, 1996, p. 489-9.
- [209] **Philip J, Silver RK, Wilson RD, Thom EA, Zachary JM, Mohide P et coll.** Late first-trimester invasive prenatal diagnosis: results of an international randomized trial? *The Am Coll Obstet Gynecol*, 1996, vol. 103, n° 6, p. 1164-73.
- [210] **Wilson RD.** Early amniocentesis : a clinical review. *Prenatal diagn* 2005, 15 :1259-73.
- [211] **Vaisbush E., Appelman Z.** Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 2007 Jan;109(1):205; 205-6.
- [212] **Kuliev AM, Jackson L, Simpson JL, Brambati B, Rhoads U, Froster U, Ginsberg N, Amiuala P, Dumez Y.** Risk evaluation of CVS. *Prenat Diagnosis* 1993, 13 : 197-209.
- [213] **Chen CH., Zhong M.** Chorionic villus sampling for prenatal diagnosis: clinical analysis of 36 cases. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2005 Apr;25(4):427-8.
- [214] **Stranc LC, Evans JA, Hamerton JL.** Chorionic villus sampling and amniocentesis for prenatal diagnosis. *Lancet* 1997, 349 :711-14.
- [215] **Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S.** Amniocentesis and chorionc villus sampling for prenatal diagnosis. *The cochrane Database of Systematic Reviews* 2003, Issue 1. Art. No. : CD003252.DOI : 10.1002/14651858.CD003252.
- [216] **Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Mac Aleese J, Descombey D, Jacquemard F, et al.** Facteurs de risques du prélèvement de sang foetal. *Rev Prat* 1994; 44: 923-926.
- [217] **Ghidini A, Sepulveda W, Lockwood CJ.** Romero R. Complications of fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1339-1344.
- [218] **Weiner CP, Wenstrom KD, Sipes SL, Williamson RA.** Risks factors for cordocentesis and fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1020-1025.
- [219] **Tongsong T, Wanapirak C, Sirirchotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P.** Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:719- 23.

- [220] Daffos F., Forestier F. Médecine et biologie du fœtus. Maloine, Paris, 1988.
- [221] Duchatel F., Oury J.-F, Menneson B., Muray J.-M. Complications of diagnsotic ultrasound-guided percutaneous umbilical blood sampling : analysis of a series of 341 cases and review of litterature. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 1993, 15, 52, 2, 95-104.
- [222] Donner C., Rypens F., Paquet V., Cohen E., Delneste D., Van Regermoter N., Vamos E., Avni F., Rodesch F. Cordocentesis for rapid karyotype : 421 consecutive cases. Fetal Diagn. Ther., 1995, 10, 3, 192-199.
- [223] Anandakumar C., Annapoorna V., Chee W.Y., Chia D., Bongso A., Ratnam S.S.
Early fetal blood sampling and its complications related to the indications for fetal blood sampling. Aust. N.Z. J. Obstet. Gynecol., 1993, 33, 3, 259-261.
- [224] Hickok D.E., Mills M. Percutaneous umbilical blood sampling : results from a multicenter collaborative registry. The Western Collaborative Perinatal Group. Am. J. Obstet. Gynecol., 1992, 166, 6Pt 1, 1614-1617.
- [225] N. Morichon-Delvallez. Cytogénétique prénatale. EMC : 5-031-A-15.
- [226] Benn PA, Perle MA. Chromosome staining and banding techniques. In: Rooney DE, Czepulkowski BH, editors. Karger; 1992. p. 91-118.
- [227] Mitelman FS. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 1995.
- [228] Hames BD, Higgins SJ. Nucleic acid hybridization. A pratical approach. Ed IRL Press. Oxford. England. 1985
- [229]: Deng G, Wu R. An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3'termini of DNA. Nuclei Acid Res 1981; 9: 4173-88
- [230] Durand B. Southern et Northern blot. Biofuture 1988;(suppl 18)
- [231] Erlich H., Saiki R.K. Specific DNA amplification. Nature 1988 ; 331 ; 461-462.
- [232] Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. : Enzymatic amplification of B globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sikle cell anemia. Science 1985; 230:1350-54

- [233] Kogan S.C., Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetics diseases by analysis of DNA sequences. N. Engl. J. Med. 1987 ; 317 :985–990.
- [234] Templeton, NS. The polymerase chain reaction, history, methods and applications. Diagn Mol Pathol 1992; 1:58
- [235] Kaplan J.C., Delpech M. Biologie moléculaire et médecine, 1 vol. (Flammarion, Médecine, Sciences), Paris, 1993.
- [236] Abdelmoula N, Portnoï MF, Amouri A, Van den Akker J, Taillemite JL. Les techniques de cytogénétique moléculaire : principes et progrès. Médecine/sciences 2000;16 : 1405–11.
- [237] Klinger K., Landes G., Locke P., Osathanondh R., Leverone B., Houseal T., Pavelka L., Dakowski W.(1992). Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization. American Journals of Genetics, 51, 55–65.
- [238] Nieuwint AW, Van Hagen JM, Heins YM, Madan K. Rapid detection of microdeletions using fluorescence in situ hybridisation on buccal smears. J Med Genet 2000;37 : E4.
- [239] Romana SP, Gosset P, Elghezal H, Le Lorc'h M, Ozilou C, Lapierre JM, et al. Apport de la cytogénétique moléculaire au diagnostic pré et postnatal des anomalies chromosomiques. J Gynécol Obstét Biol Reprod 2001;30:75–9
- [240] Knight S, Flint J. Perfect endings : a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. J.Med.Genet 2000 ; 37 :401–9.
- [241] Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chisoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiewich R, et al. The DNasequence of human chromosome 22 (see comments) published erratum appears in Nature 2000 Apr 20; 40 (6780): 904. Nature 1999 ; 402 : 489–95.
- [242] Evans M.I., Johnson M.P., Peakman D., Nicolaides K.H., Holzgreve W., Ebrahim S.A.D., Babu R., Jackson L. (1999). International collaborative assessment of 146000 prenatal karyotypes: expected limitations in only chromosome specific probes and fluorescent in situ hybridation are used. Human Reproduction, 14, 1213–1216.
- [243] Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet 1996 ; 12 : 368–75.

- [244] Schrock E, du Manoir S, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes see comments. *Science* 1996 ; 273 : 494–7.
- [245] Schrock E, Padilla-Nash H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 2000 ; 37 : 334–4.
- [246] Elghezal H, Guyader G, Radford-Weiss I. Reassessment of childhood B-lineage lymphoblastic leukemia karyotypes using spectral analysis *Chromosomes Cancer* 2001;30:383–92.
- [247] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818–21.
- [248] Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Lichter P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 ; 21 : 172–5.
- [249] D. Sanlaville, J.M. Lapierre, A. Coquin, L. Colleaux. La CGH microarray : principe et applications en pathologie constitutionnelle. *Archives de pédiatrie* 12(2005) 1515–20.
- [250] Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:399–407.
- [251] Pinkel D, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207–11.
- [252] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931–45.
- [253] Delpech M. Puces à ADN. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000;58:29–3.
- [254] Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of arraybased comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1269–76.
- [255] Shaw-Smith C, Redon R, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications. *J Med Genet* 2004;41:241–8.
- [256] Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004; 36:955–7.

- [257] Yu W, Ballif BC, Kashork CD, et al. Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet* 2003;12: 2145–52.
- [258] Redon R, RioM, Gregory SG, et al. Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or "deletion with positional effect" syndrome? *J Med Genet* 2005;42:166–71.
- [259] Van Buggenhout G, Melotte C, Dutta B, et al. MildWolf-Hirschhorn syndrome: micro-array CGH analysis of atypical 4p16.3 deletions enables refinement of the genotype-phenotype map. *J Med Genet* 2004;41:691–8.
- [260] Locke DP, Segraves R, Nicholls RD, et al. BACmicroarray analysis of 15q11–q13 rearrangements and the impact of segmental duplications. *J Med Genet* 2004;41:175–82.
- [261] Shaw CJ, Shaw CA, YuW. Comparative genomic hybridisation using a proximal 17p BAC/PAC array detects rearrangements responsible for four genomic disorders. *J Med Genet* 2004;41:113–9.
- [262] D.Germanaud, S.Audollent, J.Augé, M.Vekemans, T.Attié-Bittach. Détection moléculaire des aneuploidies les plus fréquentes par PCR quantitative fluorescente (QF-PCR). *Archives de pédiatrie* 10. 2003: 347–349.
- [263] Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, Hackeloer BJ, Kerber S, Kochhan L, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X,Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 855–60.
- [264] Forestier F, Daffos F, Rainaud M, Bruneau M, Trivin F. Blood chemistry of normal human fetuses at midtrimester of pregnancy. *Pediatr Res* 1987; 21:579–83.
- [265] Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis: on the horizon? *Pharmacogenomics* 2003; 4 : 191–200.
- [266] Bensman A. Prognosis of prenatal uropathies: should fetal urine tests be continued. *J Gynécol Obstét Biol Reprod* 1996; 25:510–514

- [267] Muller F, Dommergues M, Bussi res L, Lortat-Jacob S, Loirat C, Oury JF, et al. Development of human renal function: reference intervals for 10 biochemical markers in fetal urine. Clin Chem 1996; 42:1855-1860;
- [268] Nicolaides KH, Cheng HH, Snijders RJ, Moniz CF. Fetal urine biochemistry in the assessment of obstructive uropathy. Am J Obstet Gynecol 1992;166: 932-937.
- [269] Tassis BM, Trespidi L, Boschetto C, Nicolini U. Serum beta-2-microglobulin in fetuses with urinary tract anomalies. Am J Obstet Gynecol 1997; 176(1Pt1):54-57.
- [270] Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 2004;10: 190-212.
- [271] Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, et al. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of Toxoplasma gondii in immunocompromised patients. J Med Microbiol 2004;53:629-32.
- [272] Tang JW, Aarons E, Schalasta G, Jauniaux E, et al. Prenatal diagnosis of congenital rubella infection in the second trimester of pregnancy. Prenat Diagn 2003; 6: 509-12.
- [273] Pastuszak A, Levy M, Zuber C, Feldkamp M, Gladstone J, et al. Outcome after maternal varicella infection in the first 20 weeks of pregnancy. N Engl J Med 1994;330:901-905.
- [274] Knoll A, Louwen F, Kochanowski B, Plentz A, Stussel J, Beckenlehner K, et al. Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). J Med Virol 2002;67:259-66.
- [275] Chavini  J, Brossard Y. Les incompatibilit s sanguines 25 ans après. In : Azoulay M, Mezin R. X mes Journées de techniques avancées en gynécologie-obstétrique, p rinatologie, PMA. 1995, p. 669-92.
- [276] Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Chamberlain PF et al. Prenatal diagnosis of fetal Rh(D) status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998;339: 1734-8;
- [277] Pertl B, Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications. Obstet Gynecol 2001 Sep;98(3):483-90

- [278] **Poissonnier MH, Brossard Y, Soulié JC, Maynier M, Larsen M, de Lachaux V, Chavinié J.** Incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire. *Encycl Med Chir (Elsevier Paris) Gynécologie obstétrique* 5-020-A-20, *Pédiatrie* 4-002-R-25, 1998.
- [279] **Liley A.** Intrauterine transfusion of foetus in hemolytic disease. *Br Med* 1963 ;2 :1107-9.
- [280] **Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F.** Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *Br Med J* 1999;318:1511-1514.
- [281] **Grangeot-Keros L.** Virus de la rubéole. Les virus transmissibles de la mère à l'enfant *Médecine Science*. Paris: John Libbey Eurotext; 1999.
- [282] **Lynch L, Daffos F, Emanuel D, Giovangrandi Y, Meisel R, Forestier F, et al.** Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 1991;165:714-718.
- [283] **Rodis JF, Borgida AF, Wilson M, Leo MV, Odibo AO, Campbell WA.** Management of parvovirus infection in pregnancy and outcomes of hydrops: a survey of members of the Society of Perinatal Obstetricians. *Am J Obstet Gynecol* 1998 Oct; 179(4): 985-8.
- [284] **Lewin F, Mirlesse V.** Aspects techniques de la prise en charge des interruptions de grossesse pour pathologie fœtale. In : *Interruptions de grossesse pour pathologie fœtale*. V Midesse. Flammarion Médecine Sciences. 2002.
- [285] **M. Bolla, X. Artignan, J. Chinal.** Le praticien et le dépistage. Document Medespace-1999. JM Andrieu, P. Colonna Ed. ESTEM, Paris 1997.
- [286] **Nadel AS, Norton ME, Wilkins-Haug L.** Cost-effectiveness of strategies used in the evaluation of pregnancies complicated by elevated maternal serum alpha-fetoprotein levels. *Obstet Gynecol* 1997 May; 89(5 Pt 1):660-5.
- [287] **Gilbert RE, Augood C, Gupta R, Ades AE, Logan S, Sculpher M, van Der Meulen JH.** Screening for Down's syndrome: effects, safety, and cost effectiveness of first and second trimester strategies. *BMJ* 2001 Aug 25;323(7310):423-5;
- [288] **Cuckle H, Densem J, Wald N.** Repeat maternal serum testing in multiple marker Down's syndrome screening programmes. *Prenat Diagn* 1994 Jul;14(7) :603-7
- [289] **Green J, Statham H.** Psychosocial aspects of prenatal screening and diagnosis. In: *Troubled Helix*. Marteau, Richards (Eds). 1996. p. 140-163.

- [290] **Blumberg BD, golbus MS, Hanson KH.** The psychological sequelae of abortion performed for a genetic indication. *Am J Obstet Gynecol* 1975 Aug 1; 122(7):799–808
- [291] **Annick toutain.** Pour la pratique. *Revue du praticien*. 1997 ; 47(2) :187–90]
- [292] **Marteau TM.** Towards informed decisions about prenatal testing: a review. *Prenat Diagn* 1995;15(13) :1215–26.
- [293] **Benhardt BA, Geller G, Doksum T, Larson SM, Roter D, Holtzman NA.** Prenatal genetic testing: content of discussions between obstetric providers and pregnant women. *Obstet gynecol* 1998 may; 91(5):648–55
- [294] **Groupe de travail de l'UNAPEI.** SIDA, personne handicapée, mentale, institutions. Rapport. Paris : UNAPEI; 1998, 44p.
- [295] **Doucet H.** Diagnostic prénatal. In : Hottois G, Missa JN (dir). *Nouvelle encyclopédie de bioéthique*. Bruxelles : De Boeck Université; 2001.p.277–80
- [296] **Barjot PH, Levy G.** Interruptions de grossesse: bases et fondements éthiques. *Contraception. Fertilité. Sexualité*. 1997–Vol.25,N1:37–45.
- [297] **Code pénal marocain.** Publications de la REMALD, série “texte et documents“, n5, 1997.
- [298] **Schmorl G.** Pathologist-anatomik untersuchungen uber puerperaleklampsie. Leipzig: Vogel; 1893.
- [299] **Liou JD, Pao CC, Hor JJ, Kao SM.** Fetal cells in the maternal circulation during first trimester in pregnancies. *Hum Genet* 1993; 92 : 309–11.
- [300] **Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM.** Practical and theoretical implication of fetal/maternal lymphocyte transfer *Lancet* 1969; 1(7606): 1119–22
- [301] **Bianchi DW.** Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92 : 103–8.
- [302] **Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA.** Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 3279–83.
- [303] **Simpson JL, Elias S.** Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993 ; 270 : 2357–61

- [304] **Simpson JL, Elias S.** Isolating fetal cells from maternal blood : advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993 ; 270 : 2357–61.
- [305] **Hamada H, Arinami T, Hamaguchi H, Iwasaki H.** Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet.* 1993;9:427–32.
- [306] **Lo YMD.** Non invasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. *J Clin Pathol* 1994 ; 47 : 1060–5.
- [307] **Geifman–Holtzman O, Blatman RN, Bianchi DW.** Prenatal genetic diagnosis by isolation and analysis of fetal cells circulating in maternal blood. *Semin Perinat* 1994; 18 : 366–75.
- [308] **Bianchi DW.** Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr* 1995 ; 127 : 847–56.
- [309] **Takabayashi H, Kuwara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T.** Development of non invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn* 1995 ; 15 : 74–7.
- [310] **Elias S, Price J, Dockter M, Wachtel S, Tharapel A, Simpson JL.** First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 1992 ; 340 : 1033.
- [311] **Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Travi M, Primigari P, Caligaris–Cappio F, et al.** Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lepore. Boston disease on maternal peripheral blood. *Blood* 1990; 75: 2102–6.
- [312] **Hawes CS, Suskin HA, Kalionis B, Mueller UW, Casey G, Hall J, et al.** Detection of paternally inherited mutations for beta thalassemia in trophoblast isolated from peripheral maternal blood. *New York Academy of Sciences*; 1994. p. 181–5.
- [313] **Lo YMD, Morey AL, Wainscoat JS, Fleming KA.** Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood. *Lancet* 1994 ; 344 : 264–5.
- [314] **Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, et al.** Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn* 2002;22:609–15.
- [315] **Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF et al.** Presence of fetal DNA in aternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7

- [316] Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of foetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62:768–75.
- [317] Dumez Y, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real-time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18: 1733–6.
- [318]: Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of foetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64: 218–24.
- [318]: Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, et al. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 2004;81:638–44].
- [319] Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. First trimester fetal sex determination in maternal serum using a real-time PCR. *Prenat Diagn* 2001; 21: 1070–4.
- [320] Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, Lohmann L, Nataf V, El Halali N, et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002;119:255–60.
- [321] Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Viora E, et al. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2003;112: 617–8.
- [322] Benachi A, Steffann J, Gautier E, Ernault P, Olivi M, Dumez Y, et al. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy. *Hum Genet* 2003;113:76–9.
- [323] Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie M. Preimplantation genetic diagnosis. *Nature Rev* 2003; 3: 941–53
- [324] ESHERE Consortium preimplantation genetic diagnosis. data collection III(May 2001) *Hum Reprod* 2002;17: 233–46.
- [325] Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukhareenko V, et al. Accuracy of preimplantation diagnosis of single gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:192–8.