

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N° 15

Juillet 99

**DÉPISTAGE
DE LA TRISOMIE 21**



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.





Cher Confrère,

Nous vous proposons ci-après le Cahier de Formation de Biologie Médicale numéro 15 qui traite du dépistage de la Trisomie 21 à l'aide des marqueurs sériques maternels et du diagnostic cytogénétique. Cette partie de la pratique du biopathologiste est assurément l'une des plus critiques qu'il doive assumer compte tenu de la signification des résultats.

C'est un domaine dans lequel la collaboration entre clinicien et biologiste doit être la plus étroite possible. L'encadrement réglementaire, rappelé dans ce volume, est une donnée incontournable qui doit rester présente à l'esprit de tous les acteurs de ce dépistage.

L'ambition de ce document est de fournir une base de référence, utilisable à tous les moments des procédures techniques, vous apportant les éléments indispensables à la recherche de la qualité et à l'interprétation des résultats.

BIOFORMA s'applique tout particulièrement à solliciter des spécialistes reconnus, pour que soit mis à la disposition de tous l'information sérieuse et documentée, base de tout enseignement, ce qui est le cas sur ce sujet techniquement difficile.

Nous vous en souhaitons bonne réception et vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos confraternelles et cordiales salutations.

**Adrien BEDOSSA
Président**

DÉPISTAGE DE LA TRISOMIE 21

**à l'aide des marqueurs sériques
maternels et diagnostic cytogénétique**

Quelle femme n'a pas eu, au cours de sa grossesse, l'angoisse d'avoir un enfant « anormal » et plus particulièrement un trisomique 21 ?

On savait depuis longtemps que ce risque augmentait avec l'âge maternel. C'est en 1966 que le diagnostic par analyse chromosomique, sur cellules fœtales obtenues par amniocentèse, est mis au point. Il sera introduit en France en 1972, mais sa pratique sera longtemps réservée aux femmes âgées d'au moins 38 ans, aux couples porteurs d'anomalies chromosomiques ou dont l'enfant, d'une précédente grossesse, était trisomique. Ces indications limitaient beaucoup les possibilités diagnostiques.

De grands progrès ont été réalisés ces dernières années :

- dans les modalités du diagnostic, avec la mise au point de techniques à partir de liquide d'amniocentèses plus précoces, mais aussi de tissu trophoblastique ou de sang fœtal, autorisant la détermination du caryotype fœtal pendant toute la grossesse ;

- dans l'évaluation du risque, avec la découverte de nouveaux critères échographiques ou biologiques dont les marqueurs sériques qui vont compléter la simple notion d'âge maternel:

Ce numéro des « Cahiers de formation » permet de faire une excellente mise au point de toutes les méthodes disponibles en 1999 pour dépister la trisomie 21. Il a en effet été confié à une équipe pluridisciplinaire, qualité indispensable pour aborder, dans le cadre du diagnostic de cette affection, des aspects aussi divers et spécifiques que l'épidémiologie, la cytogénétique, la biologie ou l'échographie obstétricale.

Cette mise au point est surtout réalisée par une équipe dévouée à cette cause depuis les premiers jours du diagnostic prénatal et confrontée quotidiennement à tous les problèmes médicaux, législatifs et humains de ce dépistage.

C'est cette expérience qui reste le meilleur gage de la bonne prise en charge de ce dépistage. Il faut toujours rester conscient que, s'il est organisé et proposé systématiquement, il n'est jamais obligatoire. Il doit être et demeurer un acte individuel, proposé aux couples et choisi par eux seuls. L'équipe médicale du diagnostic prénatal n'intervient que pour les informer et les aider à réaliser la décision qu'ils ont prise, en la respectant quelle qu'elle soit.

Professeur Jacques Chavinié

LISTE DES AUTEURS

■ Agnès CHOISSET

Maître de conférences des universités-praticien hospitalier
Laboratoire de cytogénétique
Hôpital Saint-Vincent-de-Paul
82, avenue Denfert-Rochereau
75674 PARIS CEDEX 14

■ Sylvie GIRARD-ORGEOLET

Maître de conférences des universités-praticien hospitalier
Laboratoire de cytogénétique
Hôpital Saint-Vincent-de-Paul
82, avenue Denfert-Rochereau
75674 PARIS CEDEX 14

■ Jacques INGRAND

Professeur des universités-praticien hospitalier
Service de médecine nucléaire
Hôpital Cochin
27, rue du Faubourg-Saint-Jacques
75674 PARIS CEDEX 14

■ Fanny LEWIN

Praticien hospitalier
Service de gynécologie-obstétrique
Hôpital Saint-Vincent-de-Paul
82, avenue Denfert-Rochereau
75674 PARIS CEDEX 14

DÉPISTAGE DE LA TRISOMIE 21 À L'AIDE DES MARQUEURS SÉRIQUES MATERNELS ET DIAGNOSTIC CYTOGÉNÉTIQUE

INTRODUCTION.....	11
FORMES CYTOGÉNÉTIQUES ET ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA TRISOMIE 21 :	13
I - TRISOMIE 21 LIBRE ET HOMOGENE	14
I. 1- Fréquence.....	14
I. 2- Mécanismes : non-disjonction méiotique	14
I. 3- Effet de l'âge maternel	14
I. 4- Récurrence de la trisomie 21	16
I. 5- Trisomie 21 chez un apparenté	16
I. 6- Descendance des sujets atteints	16
II - TRISOMIE 21 EN MOSAÏQUE	16
III – TRISOMIE 21 PAR TRANSLOCATION	17
III. 1- Les translocations réciproques.....	17
III. 2- Les translocations robertsoniennes	17
III. 3- Ségrégation des translocations robertsoniennes	17
LE DIAGNOSTIC PRÉNATAL EN FRANCE : ORGANISATION ET LÉGISLATION	21
I - ORGANISATION DU DIAGNOSTIC PRÉNATAL	21
II - L'ENCADREMENT LÉGISLATIF ET RÉGLEMENTAIRE	21
II. 1- La consultation médicale de conseil génétique	21
II. 2- Les autorisations ministérielles des laboratoires	22
II. 3- La prise en charge du diagnostic prénatal.....	22
3.1- Le dosage des marqueurs sériques.....	22
3.2- Le caryotype fœtal	22
II. 4- Les centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal	23

III - LES DONNÉES STATISTIQUES DU DIAGNOSTIC PRENATAL EN FRANCE	23
III. 1- Évolution du diagnostic prénatal cytogénétique	23
III. 2- Effet du diagnostic prénatal sur l'incidence de la trisomie 21	23
LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA TRISOMIE 21	27
I - PRINCIPE DE L'ÉVALUATION D'UN TEST DE DÉPISTAGE	27
I. 1- Évaluation du pouvoir de repérage des malades	27
I. 2- Les pouvoirs de prédiction	28
II - LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA TRISOMIE 21	29
II. 1- L'alphafœtoprotéine (AFP)	31
II. 2- L'estriol non conjugué (uE3)	33
II. 3- L'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) et sa sous-unité β	35
II. 4- La protéine plasmatique A associée à la grossesse (PAPP-A)	40
II. 5- L'inhibine A	42
II. 6- β core urinaire	42
III - OPTIMISATION DE L'UTILISATION DES MARQUEURS	43
III. 1- Analyses effectuées pendant le deuxième trimestre	43
III. 2- Analyses effectuées pendant le premier trimestre	45
IV - LA VIE QUOTIDIENNE AU LABORATOIRE	47
ASPECTS PRATIQUES DU DÉPISTAGE PAR LES MARQUEURS SÉRIQUES MATERNELS	55
I - L'INFORMATION	55
I. 1- Ses modalités	55
I. 2- Ses difficultés	57
II - LE RESULTAT	58
ÉCHOGRAPHIE ET DÉPISTAGE DE LA TRISOMIE 21	61
I - AUX DEUXIEME ET TROISIEME TRIMESTRES DE LA GROSSESSE	61
I. 1- Les malformations viscérales majeures	61
I. 2- Les signes mineurs de dysmorphologie fœtale	62
II - AU PREMIER TRIMESTRE DE LA GROSSESSE	63

DIAGNOSTIC DE LA TRISOMIE 21	67
I - INDICATIONS DU CARYOTYPE FŒTAL	67
II - MODES DE PRÉLÈVEMENTS FŒTAUX	68
II. 1- L'amniocentèse	68
II. 2- Le prélèvement de trophoblaste	70
II. 3- Le prélèvement de sang fœtal	72
III - TECHNIQUES CYTOGÉNÉTIQUES	74
III. 1- Le caryotype	74
1.1- Trois étapes sont nécessaires à sa réalisation	74
1.2- Les cellules amniotiques.....	75
1.3- Les cellules des villosités chorales.....	76
1.4- Les lymphocytes sanguins	77
III. 2- L'hybridation in situ	77
2.1- Principe de la technique.....	77
2.2- Hybridation in situ métaphasique	77
2.3- Hybridation in situ interphasique.....	77
III. 3- La PCR quantitative	78
III. 4- La détection des cellules fœtales dans le sang maternel	79
 INTERRUPTION MÉDICALE DE GROSSESSE	 81
 ANNEXES	 83
I - EXTRAITS DES TEXTES LÉGISLATIFS ET RÉGLEMENTAIRES	83
II - LOGICIELS UTILISÉS POUR LE CALCUL DE RISQUE DE TRISOMIE 21 FŒTALE	100
III - LE CONTRÔLE DE QUALITÉ DES MARQUEURS SÉRIQUES UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC PRÉNATAL	104
IV - FICHES TECHNIQUES DE CYTOGÉNÉTIQUE	111
IV.1- Culture des cellules amniotiques et des villosités chorales	111
IV.2- Traitement hypotonique, fixation et étalement	112
IV.3- Caryotype sanguin	113
IV.4- Villosités chorales : technique directe	114
IV.5- coloration et techniques de marquage chromosomique	115

INTRODUCTION

Ce fascicule traite des aspects épidémiologiques, biologiques et obstétricaux du dépistage prénatal de la trisomie 21.

C'est volontairement qu'il n'aborde ni le versant clinique, ni la prise en charge du handicap qui, bien évidemment, restent à l'esprit des auteurs de ces textes comme à celui de tous les acteurs du diagnostic prénatal en France.

La trisomie 21 est une anomalie fréquente, touchant 1 sur 700 à 800 nouveau-nés vivants, et particulièrement redoutée par la plupart des couples.

Le diagnostic prénatal de cette affection repose sur l'établissement d'un caryotype fœtal qui présente deux difficultés : un coût élevé et la nécessité d'un prélèvement de cellules fœtales par des gestes invasifs et parfois dangereux.

La prise en charge de cet examen a été longtemps réservée aux femmes âgées de 38 ans et plus et/ou à celles présentant des signes d'appel échographiques.

Bien que le risque de trisomie augmente avec l'âge maternel, la restriction du diagnostic prénatal liée à l'âge est illogique puisque près de 70 % des enfants trisomiques naissent de mères ayant moins de 35 ans (1) (tableau 1). En conséquence, il est important de disposer d'analyses permettant de repérer le plus précocement possible les patientes présentant un risque accru avec la plus grande sensibilité et la meilleure spécificité.

Les techniques ultrasonores permettent de déceler au mieux, au cours du deuxième trimestre de gestation, 20 % des cas de trisomie 21 (2) ; la qualité de l'examen échographique dépend de l'appareillage et de l'expérience de l'opérateur.

Le diagnostic prénatal à partir de cellules fœtales isolées du sang maternel représenterait une avancée significative mais les recherches n'ont pas encore permis la mise au point de techniques applicables en routine.

Dans ces conditions, la stratégie de détermination du risque de trisomie 21 fœtale repose sur le dosage de molécules circulantes dans le sang maternel. Il permet un calcul de risque et le dépistage de 60 % des trisomies 21, en induisant environ 6 % d'amniocentèses.

Depuis 1994 et sous l'impulsion de Nicolaïdes (3), la tendance s'oriente vers un emploi combiné des marqueurs sériques et de l'échographie (essentiellement entre 10 et 15 semaines d'aménorrhée).

Le dépistage par les marqueurs sériques fait l'objet, comme le caryotype, d'un encadrement législatif et réglementaire strict et les dosages ne peuvent être réalisés que par un laboratoire autorisé.

Tableau I. Répartition des naissances normales et des naissances avec enfants trisomiques en fonction de l'âge

Age maternel (ans)	% de naissances	% enfants trisomiques
15-19	9	7
20-24	28	15
25-29	35	20
30-34	20	27
35-39	7	16
40-44	1	14
45-49	0,1	0,6

BIBLIOGRAPHIE

- 1- WALD N.J., CUCKLE H.S., DENSEM J.W., NANCHAHAL K., ROYSTON P., CHARD T., HADDOW J.E., KNIGHT G.J., PALOMAKI G.E., CANICK J.A., Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. Brit. Med. J., 1988, 297, 883-887.
- 2- GONCALVES EX., JEANTY P., PIPER J., The accuracy of prenatal ultrasonography in detecting congenital anomalies. Am. J. Obstet. Gynecol., 1994, 171, 1606-1612.
- 3- NICOLAIDES K.H., BRIZOT M.L., SNIJDERS R.J.M., Fetal nuchal translucency; ultrasound screening for fetal trisomies in the first trimester of pregnancy. Br. J. Obstet. Gynaecol., 1994, 101, 782-786.

FORMES CYTOGÉNÉTIQUES ET ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA TRISOMIE 21

SYLVIE GIRARD-ORGEOLET, AGNÈS CHOISSET

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Responsable de 25 % des handicaps mentaux sévères chez les enfants d'âge scolaire [7], la trisomie 21 est la cause la plus fréquente de retard mental. Parmi les aberrations chromosomiques à la naissance, c'est également celle dont l'incidence est la plus élevée puisqu'elle atteint un nouveau-né sur 800.

La trisomie 21 libre et homogène, c'est-à-dire la présence d'un chromosome 21 surnuméraire dans toutes les cellules de l'organisme (figure 1) est responsable du syndrome dans 93 % des cas ; les mosaïques, où la trisomie n'est présente que dans une partie des cellules, sont associées au phénotype clinique dans 3 % d'entre eux et les translocations dans moins de 5 % [10]. Les trisomies partielles sont plus exceptionnelles mais ont permis de montrer que le phénotype résulte de la présence en triple dose de la région 21q22.2-21q22.3 [16,19] (figure 2).

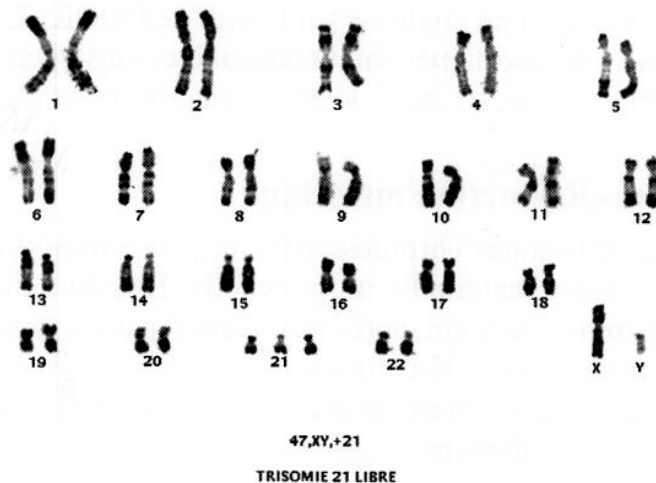


Figure 1 : Trisomie 21 libre : 47, XY, + 21. Cellules amniotiques, marquage en bandes R.

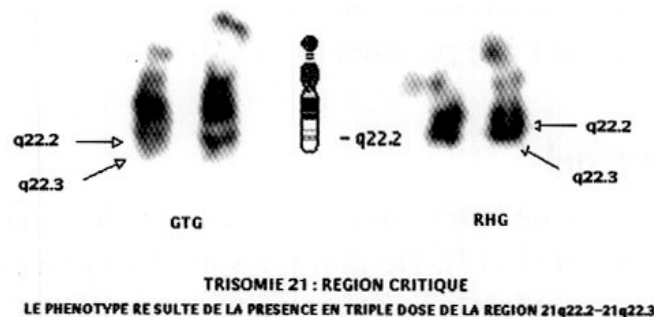


Figure 2 : La « région critique » du chromosome 21 responsable du phénotype de la trisomie 21. Montage avec marquage en bandes G (GTG), en bandes R (RHG) et idéogramme du chromosome 21.

I.1- Fréquence

I.1.1- Chez les nouveau-nés

A la naissance, la fréquence est constante dans toutes les populations et dans tous les groupes socio-économiques. Elle est de 1,25 pour mille et fortement corrélée à l'âge maternel (tableau I).

I.1.2- La sélection naturelle in utero

L'étude des produits de fausse couche spontanée du premier trimestre de la grossesse montre 60 % d'anomalies chromosomiques dont 9 % sont des trisomies 21 soit 2,3 % de toutes les fausses couches spontanées du premier trimestre. A partir de ces données, HOOK [12] estime que 75 à 80 % des embryons trisomiques 21 avortent, la majorité étant éliminée précocement. La sélection naturelle in utero se poursuit après le premier trimestre de la grossesse, comme le montrent les résultats des diagnostics prénatals par amniocentèse où la fréquence de la trisomie 21 à 16 semaines d'aménorrhée est de 25 % supérieure à celle observée à terme [8]. Ceci est confirmé par l'étude de HOOK [13, 14] sur le devenir de 43 fœtus trisomiques 21 diagnostiqués par amniocentèse, sans interruption médicale de la grossesse, où il constate un taux de 26 % de mort in utero spontanée.

I.2- Mécanisme : non-disjonction méiotique

C'est une erreur de répartition des chromosomes qui peut survenir en première ou en deuxième division de méiose maternelle ou paternelle. Elle aboutit à la formation de gamètes à 24 ou à 22 chromosomes qui, après fécondation par un gamète normal, donneront un zygote aneuploïde à 47 ou à 45 chromosomes ; cette dernière situation est la plupart du temps létale. La trisomie est présente dans toutes les cellules ; elle est homogène, à moins d'un accident mitotique ultérieur.

L'étude des polymorphismes de l'ADN par l'utilisation de sondes hautement polymorphes, très informatives, a permis de préciser l'origine de l'erreur méiotique dans 98 % des cas [1,18]. On constate que la non-disjonction est maternelle dans 95 % des cas ; lors des 5 % d'accidents paternels, l'âge maternel moyen est le même que dans la population générale. Ces données permettent d'écarter l'hypothèse ancienne selon laquelle la sélection naturelle in utero se faisait moins bien chez les mères plus âgées mais aussi de mettre fin à la controverse sur l'effet de l'âge paternel [3, 5, 20].

I.3- Effet de l'âge maternel

L'augmentation de la fréquence de la trisomie 21 avec l'âge de la mère est connue depuis les travaux de PENROSE en 1933 [17]. De multiples études épidémiologiques, colligées par HOOK [12], ont permis de préciser le risque de trisomie 21 par année d'âge (tableau I) ; elles sont concordantes dans toutes les populations étudiées et constantes dans le temps. Toutefois, les variations de l'âge moyen des mères d'enfants trisomiques observées

au cours des décennies sont dues à la baisse du nombre de grossesses après 40 ans de 1940 à 1970, suivie de son élévation en zone urbaine depuis 1980 [11]. Les causes de cet effet du vieillissement maternel sur la non-disjonction méiotique demeurent inconnues: Les très jeunes mères, entre 15 et 20 ans, ont aussi un risque de trisomie 21 très légèrement accru par rapport à celles de la tranche d'âge de 20 à 25 ans, mais leur risque reste inférieur à celui des mères de 25 à 30 ans.

Tableau I : Âge maternel et risque de trisomie 21
(d'après Hook, 1981)

Âge maternel à terme	Risque à terme	Risque au 2 ^e trimestre
20	1/1734	1/1231
21	1/1612	1/1145
22	1/1500	1/1065
23	1/1408	1/1000
24	1/1327	1/942
25	1/1250	1/887
26	1/1186	1/842
27	1/1124	1/798
28	1/1064	1/755
29	1/1014	1/721
30	1/965	1/685
31	1/915	1/650
32	1/794	1/563
33	1/637	1/452
34	1/496	1/352
35	1/386	1/274
36	1/300	1/213
37	1/234	1/166
38	1/182	1/129
39	1/141	1/100
40	1/110	1/78
41	1/86	1/61
42	1/66	1/47
43	1/52	1/37
44	1/40	1/29
45	1/31	1/22
46	1/24	1/17
47	1/19	1/13
48	1/15	1/10
49	1/11	1/8

I.4- Récurrence de la trisomie 21 libre

I.4.1- Données épidémiologiques

Si un couple a donné naissance à un enfant atteint de trisomie 21 libre, le risque de récurrence dépend à la fois de l'âge de la mère lors de la naissance de cet enfant et de son âge actuel [21]. CUCKLE et WALD [6] ont fait la synthèse des principales études (tableau II) et concluent que le risque de récurrence correspond à celui d'une mère du même âge, majoré d'environ 0,4 % à la date de l'amniocentèse et de 0,3 % à terme.

Aucune explication satisfaisante ne rend compte de ce risque accru, la réalité d'une tendance à la non-disjonction n'a pu être démontrée.

*Tableau II : Risque de récurrence de la trisomie 21 libre
(d'après Cuckle et Wald, 1990)*

Age maternel au moment du diagnostic prénatal	Risque observé	Risque en excès
< 25 ans	0,86 %	0,78 %
25-34 ans	0,46 %	0,32 %
> 35 ans	1,35 %	0,50 %

I.4.2- Mosaïques parentales

Elles sont exceptionnelles et conduisent, en théorie, à un risque élevé de récurrence. Toutefois, ce risque dépend de la proportion de cellules atteintes dans les gonades non accessibles à l'exploration cytogénétique

I.5- Trisomie 21 chez un apparenté

Lorsqu'un apparenté est atteint de trisomie 21, les données disponibles n'apportent aucun argument concluant en faveur de l'augmentation du risque pour les autres membres de la famille [9]. Bien entendu, il est indispensable de connaître la forme cytogénétique du cas index, afin de vérifier qu'il ne s'agit pas d'une translocation familiale.

I.6- Descendance des sujets atteints

Aucun cas avéré de descendance d'homme atteint de trisomie 21 n'est signalé (stérilité). Pour les femmes, la fertilité semble conservée : dans une série de 25 enfants nés de mères trisomiques 21 [15], 10 étaient atteints et 15 avaient un caryotype normal.

■ II. TRISOMIE 21 EN MOSAÏQUE

Une mosaïque résulte de la non-disjonction mitotique post-zygotique, à partir d'un œuf soit initialement normal, soit trisomique. Deux populations cellulaires coexistent, l'une normale, l'autre avec trois chromosomes 21, en proportion variable d'un tissu à l'autre.

2,7 % des sujets avec un phénotype de trisomie 21 ont une mosaïque, mais la gravité du syndrome dépend de la quantité de cellules anormales et surtout de leur localisation tissulaire ; c'est pourquoi le pourcentage de cellules atteintes dans les tissus accessibles au caryotype (lymphocytes sanguins notamment) ne permet pas d'émettre un pronostic. Le phénotype peut être normal, comme cela est parfois observé chez les parents d'enfants atteints de trisomie homogène.

■ III. TRISOMIE 21 PAR TRANSLOCATION

Les translocations sont à l'origine de moins de 5 % des trisomies. Elles sont de novo le plus souvent.

Dans **les translocations de novo**, les deux parents ont un caryotype normal ; la translocation survient comme un événement sporadique sans risque particulier de récurrence.

En revanche, dans **les translocations héritées**, le risque de récurrence est élevé dans la descendance de celui qui porte le remaniement équilibré et dépend du type de translocation.

III.1- Les translocations réciproques

Elles résultent de l'échange de fragments chromosomiques entre deux chromosomes non homologues de n'importe quelle paire chromosomique ; lorsqu'un chromosome 21 est impliqué dans ces translocations, le déséquilibre qui en résulte peut conduire, selon son type, à une trisomie 21 complète ou partielle.

III.2- Les translocations robertsoniennes

Dites par fusion centromérique, elles résultent de la réunion de deux chromosomes acrocentriques, c'est-à-dire les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 ; elles impliquent la perte, sans conséquence phénotypique, des bras courts de ces acrocentriques, constitués de plusieurs copies d'ADN codant pour l'ARN ribosomal ; elles peuvent survenir entre deux homologues ou entre deux chromosomes de paires différentes ; lorsqu'elles sont équilibrées, le caryotype comporte 45 chromosomes et le phénotype est normal.

III.3- Ségrégation des translocations robertsoniennes (figure 3)

Lors de la méiose, les translocations robertsoniennes peuvent conduire à la formation de gamètes déséquilibrés ; dans ce cas, il s'agit presque toujours d'un zygote trisomique à 46 chromosomes, les monosomies étant toujours létales.

Pour les translocations robertsoniennes, le risque théorique de trisomie 21 est de 1/3 mais la fréquence observée est beaucoup plus faible à cause de la surmortalité in utero des trisomies. On constate également que, si la mère porte la translocation, le risque de donner naissance à un enfant trisomique est de 15 % alors qu'il n'est que de 5 % si c'est le père [4,9]. Les descendants sains sont pour moitié porteurs de la translocation équilibrée.

SEGREGATION DE LA TRANSLOCATION 14;21

ROBERTSONIENNE

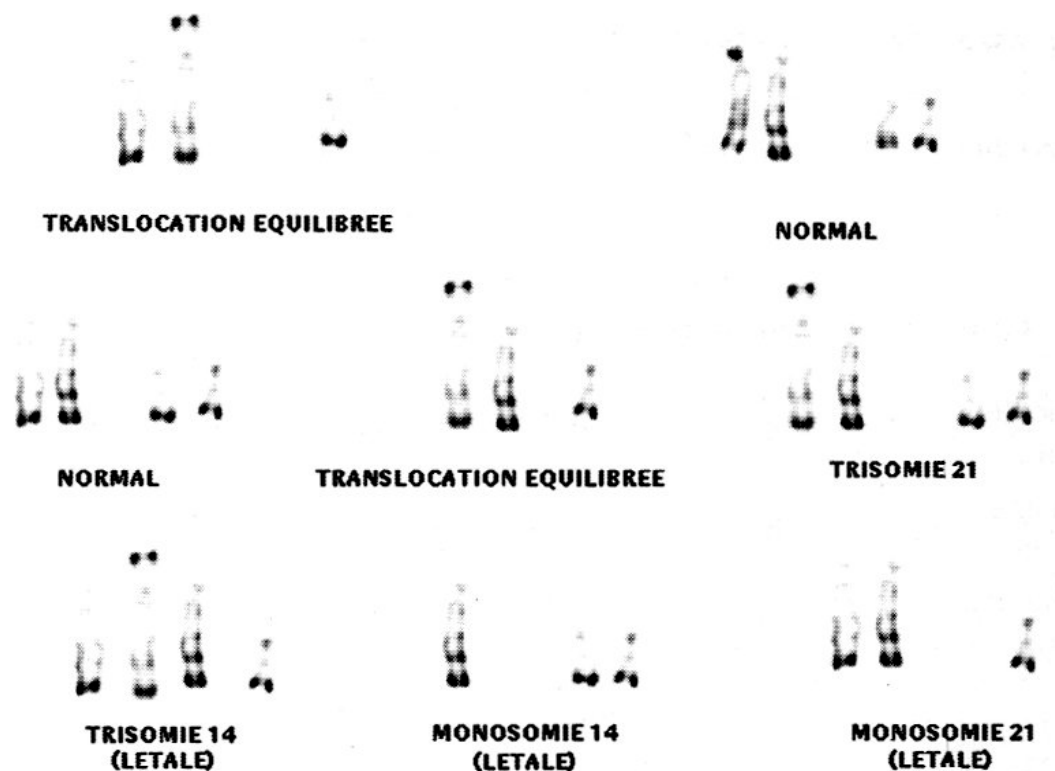


Figure 3 : Ségrégation d'une translocation robertsonienne entre un chromosome 14 et un chromosome 21 : 45,XX/Y,t(14;21)(p11;q11). Montage avec marquage en bandes R. La méiose peut aboutir à la formation de six gamètes différents. Après fécondation, trois des zygotes qui en résultent sont viables, les trois autres éliminés précocement.

Dans l'exemple de la translocation 14 ; 21, la ségrégation méiotique peut aboutir à six types de gamètes et conduire, après fécondation avec le gamète normal de l'autre parent, aux six possibilités suivantes (figure 3) :

- caryotype normal,
- translocation 14 ; 21 équilibrée,
- trisomie 21,
- trisomie 14 (létale),
- monosomie 14 (létale),
- monosomie 21 (létale).

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

La translocation 21 ; 21 par fusion centrique est particulière puisqu'un sujet porteur équilibré aura 100 % de zygotes trisomiques 21, la monosomie complète et homogène étant toujours létale.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANTONARAKIS S.E., Molecular characterization of chromosome 21 and Down syndrome. 8th International congress of human genetics, Washington, Oct. 1991 (abstract).
- 2- ANTONARAKIS S.E. and the Down syndrome collaborative group., Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 324, 872-876.
- 3- AYME S., Épidémiologie de la trisomie 21 : données récentes. 10^e Séminaire de diagnostic anténatal des malformations, Paris, Nov. 1991.
- 4- BOUE A., GALLANO P., A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1,356 prenatal diagnoses. *Prenat. Diagn.*, 1984,4, 45-67.
- 5- CROSS P.K., HOOK E.B., An analysis of paternal age and 47, + 21 in 35,000 new prenatal cytogenetic data from the New York State Chromosome Registry : no significant effect. *Hum. Genet.*, 1987, 77, 299-302.
- 6- CUCKLE H. S ., WALD N.J., Screening for Down syndrome. *In : Prenatal diagnosis and prognosis*, Lilford R., Butterworth & Co., London, 1990, 67-92.
- 7- FERGUSON-SMITH M.A., Prenatal chromosome analysis and its impact on the birth incidence of chromosome disorders. *Br. Med. J.*, 1983, 4, 355-364.
- 8- FERGUSON-SMITH M.A., YATES J.R.W., Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a Collaborative European Study on 52,965 amniocenteses. *Prenat. Diagn.*, 1984, 4, 5-44.
- 9- GARDNER R.M.J., SUTHERLAND G.R., Down syndrome. *In: Chromosomes abnormalities and genetic counseling*, Gardner R.M.J., Sutherland G.R., Oxford University Press, Oxford, 1989, 137-143 .
- 10- GIRAUD F., MATTEI J.F., Aspects épidémiologiques de la trisomie 21. *J. Hum. Genet.*, 1975, 23, 1-30.
- 11- GOUJARD J., ANCEL P.Y., VODOVAR V., DE VIGAN C., Dépistage de la trisomie 21. Effets des programmes de dépistage. *In : Diagnostic et prise en charge des affections fœtales*. Association Saint-Vincent-de-Paul, éd. Vigot, 1996, 5-11.
- 12- HOOK E.B., Down syndrome. Frequency in human populations and factors pertinent to variation in rates. *In : Trisomy 21. Research perspectives*, De la Cruz F.F., Gerald P.S. NICDH-Mental Retardation Research Center Series. University Park Press, Baltimore, 1981, 3-67.
- 13- HOOK E.B., Chromosome abnormalities and spontaneous fetal death following amniocenteses: further data and associations with maternal age. *Am. J. Hum. Genet.*, 1983, 35, 110-116.
- 14- HOOK E.B ., The natural history of cytogenetically abnormal fetuses detected at amniocenteses which are not terminated electively. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, 45, 855-861.

- 15- JAGIELO G., Reproduction in Down syndrome. *In : Trisomy 21. Research perspectives*, De la Cruz F.F., Gerald P.S. NICDH-Mental Retardation Research Center Series. University Park Press, Baltimore, 1981, 151-152.
- 16- MATTEI J.F., MATTEI M.G., BAETEMAN M.A., GIRAUD F., Trisomy 21 for the region 21q22. 3: identification by high resolution R banding patterns. *Hum. Genet.*, 1981, 56, 409-411.
- 17- PENROSE L.S., The relative effect of paternal and maternal age in mongolism. *J. Genet.*, 1933, 27, 219-224.
- 18- PETERSEN M.B., POULSEN H., MIKKELSEN M., FRANTZEN M., SAND A., Comparative study of PCR and chromosomal markers in the detection of the origin of the additional chromosome 21 in Down syndrome. 8th International congress of human genetics, Washington, Oct. 1991 (abstract).
- 19- SINET P.M., RAHMANI Z., THEOPHILE D., CHETTOUH Z., BLOUIN J.L., PRIEUR M., NOEL B., PANGALOS C., MATTEI J.F., KRAUS J., DELABAR J.M., Critical region on chromosome 21 for the pathogenesis of Down syndrome: molecular definition. Colloque franco israélien de génétique humaine, Paris, Janv. 1992.
- 20- STENE E., STENE J., STENGEL-RUTKOWSKI S., Controversy: paternal age effect in chromosomal disorders. A reanalysis of the New York State prenatal diagnoses data on Down syndrome and paternal age effects. *Hum. Genet.*, 1987, 77, 299-302.
- 21- STENE J., STENE E., MIKKELSEN M., Risk for chromosome abnormality at amniocentesis following a child with non-inherited chromosome aberration. A European Collaborative Study on Prenatal Diagnoses. *Prenat. Diagn.*, 1984, 4, 81-95.

LE DIAGNOSTIC PRÉNATAL EN FRANCE

ORGANISATION ET LÉGISLATION

SYLVIE GIRARD-ORGEOLET, AGNÈS CHOISSET

CAHIER
DE
Formation
version numérique

■ I. ORGANISATION DU DIAGNOSTIC PRÉNATAL

Durant les décennies 70 et 80, les laboratoires de diagnostic prénatal, regroupés en une structure associative, l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE), fonctionnaient grâce à un système de financement forfaitaire sous forme de convention avec la Sécurité sociale. Cette association assurait alors la collecte quasi exhaustive et l'exploitation statistique de l'ensemble des données françaises du diagnostic prénatal biologique des maladies génétiques. En 1991, le caryotype fœtal rejoint le « droit commun » par son inscription à la nomenclature des actes de biologie. L'exploitation des résultats est assurée par le ministère en charge de la Santé à partir des rapports d'activité annuels fournis par les laboratoires. L'organisation du diagnostic prénatal est pilotée par la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal.

■ II. L'ENCADREMENT LÉGISLATIF ET RÉGLEMENTAIRE [1]

La loi 94-654 du 29 juillet 1994 *relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal* et ses décrets d'application précisent les conditions du diagnostic prénatal et sa définition : « *Le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales ayant pour but de détecter in utero chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité* ».

Cette loi doit être réexaminée par le Parlement en 1999.

II.1- La consultation médicale de conseil génétique

Elle est obligatoire avant tout prélèvement pour diagnostic prénatal. Son intérêt, son contenu, ses modalités pratiques sont précisés par les décrets 95-559 du 6 mai 1995 et 97-579 du 28 mai 1997. Elle vise à évaluer le risque de maladie génétique pour l'enfant à naître, à informer la femme enceinte sur l'affection recherchée, le risque des prélèvements fœtaux, les résultats que l'on peut attendre des tests biologiques. Le **consentement écrit de la patiente** est recueilli conformément à un modèle fixé par arrêté.

Le médecin rédige une **attestation prouvant cette consultation**. Cette attestation ainsi que la copie du consentement écrit de la patiente sont adressées au laboratoire en charge de l'examen. Celui-ci doit conserver ces documents avec le résultat de l'analyse.

Aucune qualification n'est requise pour le médecin consultant : médecin généraliste, obstétricien, généticien.

Le résultat de l'analyse prénatale ne doit être remis à la femme enceinte que par l'intermédiaire de son médecin prescripteur (décret 97-579 du 28 mai 1997).

Aucune autorisation n'est nécessaire pour les actes cliniques et les prélèvements embryonnaires et fœtaux.

II.2- Les autorisations ministérielles des laboratoires

Les laboratoires, qui effectuent ces examens biologiques de diagnostic prénatal, sont tenus d'être titulaires d'une autorisation délivrée par le ministre en charge la Santé après avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal, et du Comité national de l'organisation sanitaire et sociale. Cette autorisation est délivrée pour une durée de cinq ans au laboratoire d'analyses médicales ou à l'établissement de santé, sous la responsabilité exclusive de praticiens nommément désignés dans la décision ministérielle. Elle est valide à compter de la date de la visite de conformité de la DDASS.

Ces autorisations concernent toutes les activités biologiques de diagnostic prénatal au sens défini par la loi (affection d'une particulière gravité), y compris les tests sanguins maternels, et ne sont pas nécessaires pour les autres examens complémentaires comme la numération fœtale ou le dosage de la bilirubine...

Si plusieurs activités sont pratiquées dans un même laboratoire, une autorisation sera demandée pour chacune d'elles.

Seule l'activité de dosage des marqueurs sériques maternels dépend de la carte sanitaire et est soumise à un « indice » de un laboratoire pour 125 000 femmes de 20 à 40 ans (arrêté du 3 août 1995).

II.3- La prise en charge du diagnostic prénatal

II.3.1- Le dosage des marqueurs sériques

Le dosage des marqueurs est coté B180 pour au moins deux marqueurs dont l'hCG. L'examen ne peut être pratiqué qu'au cours des 15^e, 16^e, 17^e, et 18^e semaines d'aménorrhée.

II.3.2- Le caryotype fœtal

Il n'est remboursé - à 100 % - que pour les indications précisées par arrêté.

Il est soumis à la procédure « d'entente préalable », sur un formulaire type signé à la fois par le prescripteur et par le responsable autorisé du laboratoire. L'indication du diagnostic y est inscrite. Pour les signes d'appel échographiques et pour les marqueurs sériques maternels, le compte rendu échographique ou le résultat biologique doit être joint à l'envoi.

L'acte est coté B1300 pour les techniques avec culture cellulaire (cellules amniotiques, villosités chorales) et B850 sans culture (sang fœtal, technique directe des villosités).

II.4- Les centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal

La loi du 29 juillet 1994 institue la création de centres de diagnostic prénatal pluridisciplinaires dont la composition, les missions et les modalités d'agrément sont définies par le décret 97-578 du 28 mai 1997.

Ces centres ne peuvent être créés que dans des organismes ou établissements de santé publics ou à but non lucratif.

La mission première de ces centres est d'encadrer l'interruption médicale de grossesse et le diagnostic préimplantatoire. Elle est aussi de favoriser l'accès des patientes à l'ensemble des activités de diagnostic prénatal, de donner des avis et conseils dans ce domaine et d'assurer des actions de formation pour les praticiens.

Toutefois, les activités cliniques et biologiques de diagnostic prénatal peuvent se poursuivre en dehors de ces centres.

■ III. LES DONNÉES STATISTIQUES DU DIAGNOSTIC PRÉNATAL EN FRANCE

III.1- Evolution du diagnostic prénatal cytogénétique

Le diagnostic prénatal s'est développé en France, depuis 1972, sous l'impulsion de quelques laboratoires. Le caryotype fœtal est d'abord réservé aux femmes de plus de 40 ans et aux couples porteurs eux-mêmes d'un remaniement chromosomique. Il est proposé depuis 1980 aux femmes de plus de 38 ans, aux couples ayant eu un enfant atteint d'une anomalie chromosomique, puis étendu aux signes d'appel échographiques. Le nombre de diagnostics prénatals chromosomiques augmente massivement, de 2 800 en 1980 pour une dizaine de laboratoires à plus de 45 000 en 1993 pour 65 laboratoires [2, 3, 4].

Le dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels débute en 1989 sous forme d'une étude pilote regroupant quelques centres. Le nombre de caryotypes fœtaux induits par ces marqueurs passe de 2 000 en 1990 à 4 000 en 1993.

Le remboursement de ce dépistage est assuré à partir de janvier 1997, pour une période probatoire de deux ans destinée à évaluer son efficacité. Les données de 1997, communiquées par le ministère de la Santé montrent que « le dosage des marqueurs sériques a été demandé par 52 % des femmes enceintes, soit 379 384 femmes, dont 5 700 âgées de plus de 38 ans. Il a permis un dépistage de 443 cas de trisomie 21 (soit 1 cas sur 856) dont 125 chez les femmes âgées de plus de 38 ans (1 cas sur 46). Par ailleurs, 87 anomalies du tube neural et 22 autres anomalies chromosomiques (trisomies 13 et 18) ont également été détectées à l'occasion de ces tests ». Cette évaluation montre l'efficacité du dépistage l'arrêté du 16 février 1999 proroge son inscription à la nomenclature.

III.2- Effet du diagnostic prénatal sur l'incidence de la trisomie 21

On ne dispose pas de données nationales sur les interruptions médicales de grossesse et les naissances d'enfants atteints de trisomie 21. En revanche on connaît :

1- le taux de couverture du diagnostic cytogénétique chez les mères de plus de 38 ans : de 13 % en 1980, il s'est stabilisé autour de 60 % de 1990 à 1993 [2,3,4].

2- les données des registres de surveillance épidémiologique des malformations congénitales.

Il existe en France quatre registres (Paris, Bouches-du-Rhône, Centre-Est, Bas-Rhin) qui disposent des données exhaustives sur les naissances et les interruptions médicales de grossesse pour le quart de la population française. On sait ainsi que, pour le registre de Paris [4] le taux de diagnostic prénatal de la trisomie 21 est de 39 % en 1985 et de 80 % en 1996, 72 % de ces diagnostics étant suivis d'une interruption médicale de la grossesse. On constate aussi que depuis 1980, l'incidence de la trisomie 21 augmente à Paris en même temps que l'élévation de l'âge des mères.

BIBLIOGRAPHIE

1- Textes législatifs et réglementaires en annexe.

2- BRIARD M.L., Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant.

Les résultats du diagnostic anténatal en France : 1980-1990.

La Dépêche, 1991.

3- **Direction générale de la santé.** Ministère de la santé.

Rapporteur : M.L. Briard.

Activité des laboratoires de cytogénétique

I- Années 1990 -1991.

II- Années 1992-1993.

4- GOUJARD J., DEHÉ S., DE VIGAN C., VODOVAR V., VÉRITÉ V., Douze années de surveillance épidémiologique des malformations congénitales à Paris (1985-1996). Registre des malformations congénitales de Paris. Janvier 1999.

LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA TRISOMIE 21 JACQUES INGRAND

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. PRINCIPES DE L'ÉVALUATION D'UN TEST DE DÉPISTAGE

On appelle test de dépistage un test qui permet de sélectionner dans la population générale les personnes porteuses d'une affection définie. Utilisé a priori, de façon systématique et non pas en fonction de symptômes, les connaissances obtenues par l'examen clinique ne peuvent lui être appliquées.

I.1- Évaluation du pouvoir de repérage des malades

La sensibilité (Se) est l'aptitude d'un test à repérer les malades. C'est le pourcentage de malades pour lesquels le test est positif.

La spécificité (Sp) est l'aptitude d'un test à repérer les non-malades. C'est le pourcentage de non-malades pour lesquels le test est négatif.

a) Test qualitatif (à réponse binaire : + ou -)

Après avoir appliqué un test à des malades, les résultats peuvent être présentés ainsi :

	nombre de malades (M)	nombre de non-malades (NM)	
Test +	a	b	
Test -	c	d	
on appelle	a	les vrais positifs	(VP)
	b	les faux positifs	(FP)
	c	les faux négatifs	(FN)
	d	les vrais négatifs	(VN)

d'où la sensibilité (Se) = $\frac{VP}{VP + FN}$ (proportion de VP parmi les malades) et la spécificité

(Sp) = $\frac{VN}{VN + FP}$ (proportion de VN parmi les non-malades)

b) Test quantitatif

C'est le plus fréquent et c'est celui qu'on rencontre dans le cas des marqueurs biochimiques. Alors que sensibilité et spécificité sont fixes pour un test qualitatif, leur valeur dépend du seuil de décision en cas de test quantitatif.

La figure 1 indique les distributions des valeurs de concentration d'un test pratiqué sur des malades M et des non-malades NM. On voit qu'il existe une zone de chevauchement entre les distributions. Pour un seuil C1 (fig. 1 a), le test est hautement sensible, mais peu spécifique ; pour un seuil C3, c'est le contraire.

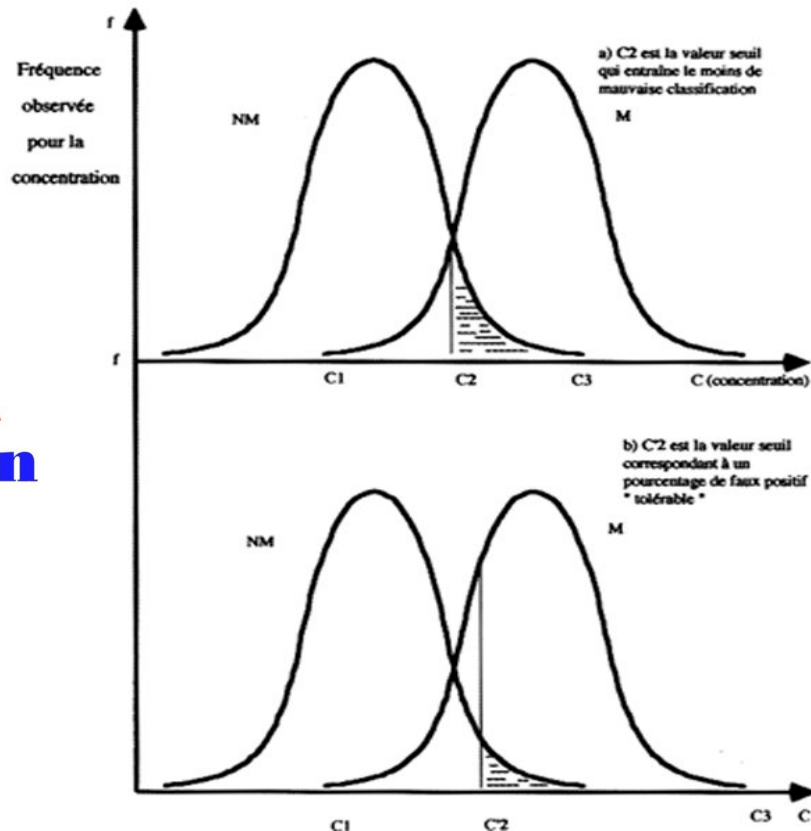


Figure 1 : Distribution des valeurs de concentration d'un test quantitatif ; en a, on a cherché à réduire au minimum le nombre de malades mal classés ; en b, le seuil de décision choisi est fixé pour améliorer la spécificité, aux dépens de la sensibilité (la zone hachurée correspond au pourcentage de faux positifs).

La figure 1b illustre parfaitement la situation en matière de marqueurs biochimiques de risque de trisomie 21. La fixation du seuil de décision tient compte du pourcentage de faux positifs qui peut être toléré (voisin de 5 %) ; dans ces conditions, la spécificité avoisine 95 %, la sensibilité 60 % .

I.2- Les pouvoirs de prédiction (3)

Si les mesures de concentration ont été faites sur des échantillons de N et NM représentatifs des populations explorées, on peut introduire :

- la valeur rédictive positive $VPP = \frac{VP}{VP + FP}$, pourcentage de malades parmi ceux dont le test est positif

- la valeur rédictive négative $VPN = \frac{VN}{VN + FC}$, pourcentage de non-malades parmi les personnes dont le test est négatif.

Si l'échantillonnage ne reproduit pas la population explorée, l'estimation de VPP et de VPN fait appel au théorème de BAYES. Largement appliqué, il introduit la notion de prévalence (p) qui indique dans une population donnée le pourcentage de sujets malades.

Cette prévalence dépend du recrutement des patients (population générale, clientèle de généraliste, clientèle de spécialiste).

Quand la prévalence de la maladie augmente de 0 à 1, la VPP augmente de 0 à 1 (elle est très faible dans une population où la maladie est rare) et la VPN diminue de 1 à 0 (elle est très faible dans une population où la maladie est fréquente).

On utilise les formules suivantes :

$$VPP = \frac{p \cdot Se}{p \cdot Se + (1 - p)(1 - Sp)}$$

$$VPN = \frac{(1 - p) \cdot Sp}{(1 - p) \cdot Sp + p(1 - Se)}$$

Dans le cas de femmes enceintes, la prévalence de la trisomie augmentant avec l'âge (voir tableau I), la VPP (pour des Se et Sp constantes) sera meilleure pour les femmes plus âgées.

Tableau I : Risque estimé de trisomie 21 en fonction de l'âge maternel (1)

Age maternel (ans)	Risque
20	1 : 1528
25	1 : 1351
30	1 : 909
35	1 : 384
40	1 : 112
45	1 : 25

■ II. LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA TRISOMIE 21

Les principaux marqueurs biologiques de la trisomie 21 sont l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) (molécule entière ou sous-unité bêta libre) et l'alphafœtoprotéine. Certains auteurs utilisent l'estriol non conjugué (uE3), d'autres la PAPP-A (Pregnancy associated plasma protein A), l'inhibine A dimérique et le fragment β -core de l'hCG ; la SP 1 (Schwangerschaft protein) est parfois mentionnée.

La plupart des études ont été menées pendant le second trimestre de la grossesse (de la 15^e à la 18^e semaine), mais de nombreux centres cherchent à mettre au point une stratégie applicable au premier trimestre de la grossesse.

Avant de présenter les différents marqueurs, leurs caractéristiques et leurs valeurs usuelles normales ou associées à un fœtus trisomique, nous voudrions insister sur cinq points.

- Le premier concerne le fait que les analyses sont effectuées sur le sang maternel : toute diminution ou augmentation d'un marqueur est le reflet d'un dysfonctionnement du fœtus sans qu'on puisse toujours définir la cause du passage dans le sang maternel (transport passif, érosion de la caduque basale etc.).

- Le second a trait à une particularité méthodologique, celle d'avoir à utiliser pour les sérums testés une expression inusuelle de la concentration, l'expression en MoM (multiple of the median). Cette particularité implique que chaque laboratoire ait pu déterminer une médiane à partir des concentrations individuelles d'une population de femmes enceintes normales. (La médiane est la valeur observée lorsqu'on trie les concentrations dans l'ordre croissant ou décroissant, en regard de l'élément qui sépare la population en deux sous-groupes numériquement égaux ; la médiane, qui n'est pas la moyenne, correspond au 50^e percentile). L'intérêt de l'expression en MoM est de permettre de comparer les résultats de mesures provenant de différents laboratoires, susceptibles d'utiliser des réactifs différents et surtout d'homogénéiser les résultats obtenus pour différentes semaines de la gestation.

- Le troisième point est la nécessité absolue de dater exactement le terme de gestation à l'aide de la biométrie fœtale (diamètre bipariétal, longueur du fémur), de préférence au calcul à partir de la date des dernières règles.

- Le quatrième touche à la méthodologie du calcul du risque cumulé (âge maternel et concentration d'un marqueur). Le principe du calcul consiste à multiplier le risque déterminé en fonction de l'âge maternel par un facteur de multiplication (f) obtenu à partir des courbes de distribution des concentrations du marqueur observées dans les grossesses normales et les grossesses avec trisomie 21 (4, 5) ; f est le rapport des hauteurs de distribution considérées comme gaussiennes pour les grossesses affectées et non affectées en regard de la concentration mesurée exprimée en MoM (fig. 2).

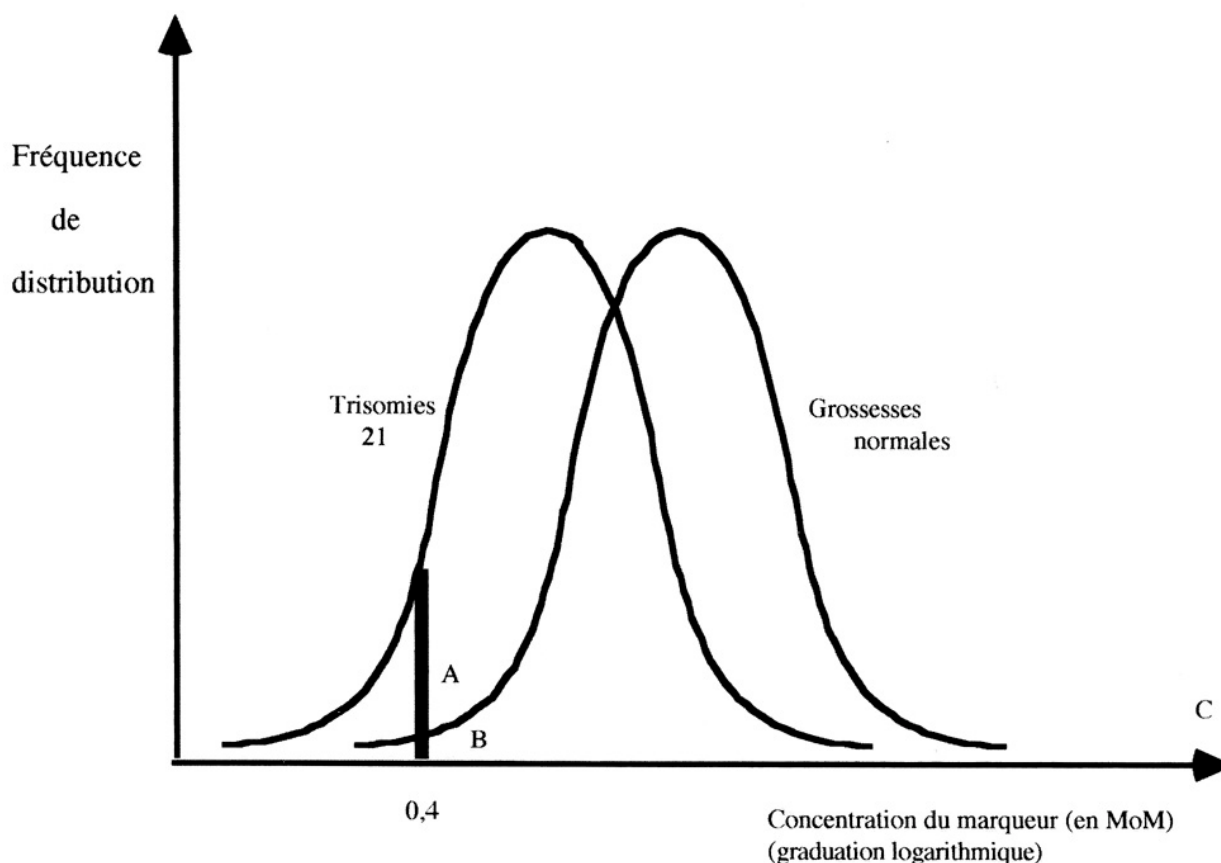


Figure 2 : Exemple de calcul du facteur de multiplication f en fonction de la concentration du marqueur (pour $C = 0,4$ MoM, $f = A/B = 3,1$) (d'où pour une patiente de 35 ans, un risque cumulé de $1/386 \times 3,1 = 1/124$).

En fait, le calcul du risque est effectué à l'aide d'un logiciel commercial proposé par les industriels (en 1995, on dénombrait près de 9 Sociétés ayant mis au point des logiciels plus ou moins sophistiqués : SMS, Alpha, Dermalog, Downcalc, Kick-off, Prenval II, Prenata, Prisca, Screenlab : voir annexe II). Selon les cas ces logiciels peuvent intégrer dans le calcul du risque la notion de race, de tabagisme, de diabète et même parfois prendre en compte les données de l'échographie.

- Le cinquième point est l'intérêt d'informations apportées par les marqueurs biochimiques qui dépassent le cadre de la trisomie 21 : trisomie 18, défaut de fermeture du tube neural, complications du 3^e trimestre etc.

II.1- Alphafœtoprotéine(AFP)

L'AFP est le premier des marqueurs biochimiques pour lequel un lien a pu être établi entre la présence d'une trisomie 21 chez le fœtus et une perturbation de sa concentration dans le sang maternel (b, 9).

a) Origine

Au cours de la grossesse, l'AFP est synthétisée par la vésicule ombilicale au début de la gestation, puis par le tractus intestinal et le foie du fœtus.

b) Notions sommaires de physiologie

L'AFP est une globuline glycosylée dont le poids moléculaire apparent est de 70 000 daltons. La concentration dans le sérum fœtal atteint un maximum autour de la 13^e semaine de grossesse, puis décroît régulièrement. Excrétée dans l'urine, elle se retrouve dans le liquide amniotique à une concentration environ 150 fois plus faible que dans le sang fœtal. La diffusion d'une faible quantité vers le sérum maternel à travers le placenta permet son dosage chez la femme enceinte (fig. 3).

À titre indicatif, le tableau II donne l'allure de l'évolution de la concentration d'AFP entre la 15^e et la 18^e semaine d'aménorrhée. Le rôle de l'AFP chez le fœtus n'est pas élucidé à ce jour ; elle pourrait empêcher le rejet du fœtus par la mère.

Tableau II : Exemple de médianes des concentrations d'AFP en fonction de la durée de gestation (grossesses normales) (la concentration en U/ml est exprimée par rapport au standard IRP 72/225 pour lequel 1 ng = 1 U.I.) (réactif AMERLEX d'Ortho Clinical Diagnostics)

Semaines d'aménorrhée	Médiane	Intervalle de distribution
14	26,7	24,3-29,4
15	30,1	27,6-32,7
16	33,8	31,1-36,8
17	38,1	34,8-41,7
18	42,9	38,7-47,6

c) Intérêt du dosage

Cet intérêt est double

- Les concentrations d'AFP dans le sang maternel en présence d'un fœtus trisomique sont plus basses (0,7 MoM par rapport aux valeurs d'AFP observées en l'absence de trisomie).

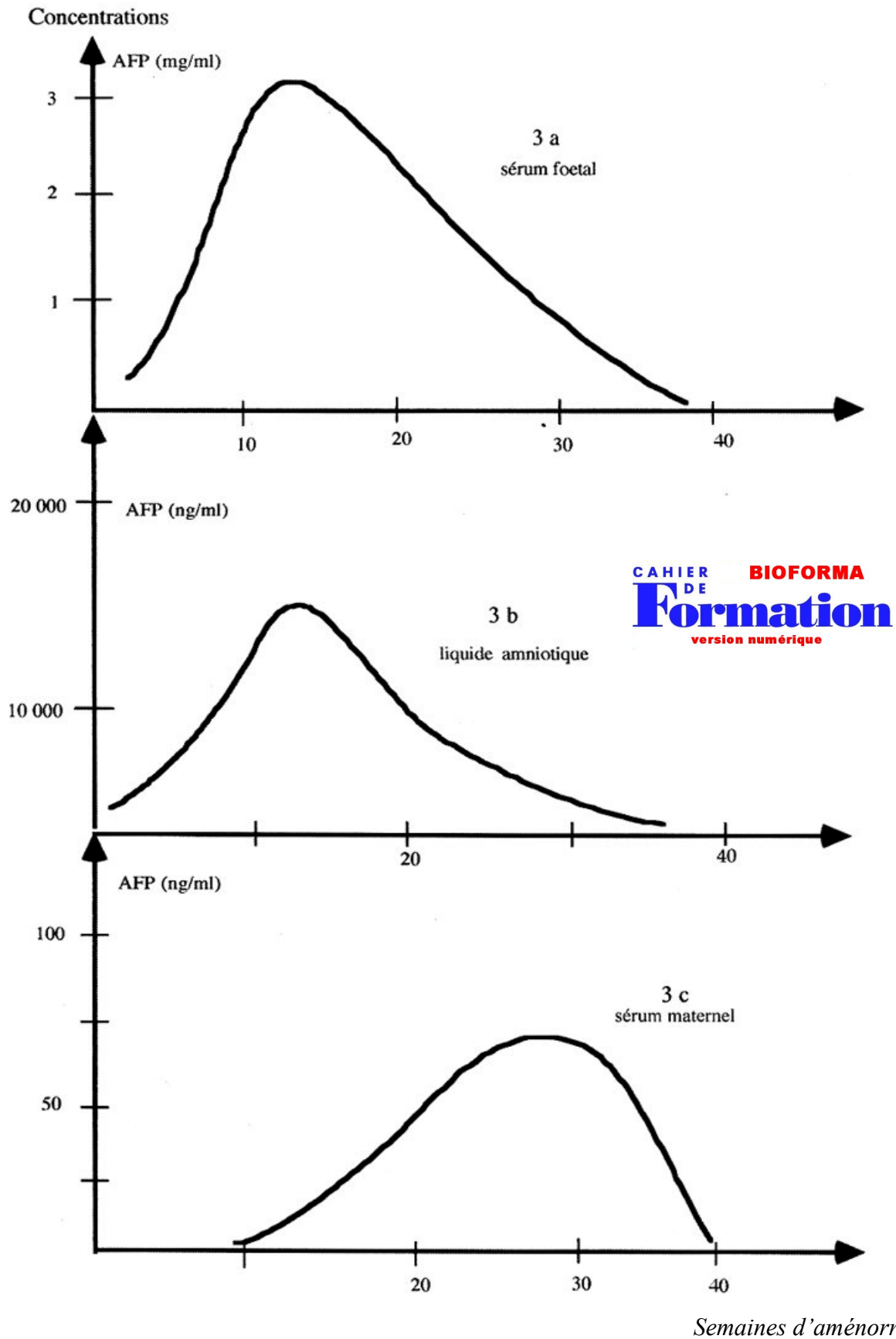


Figure 3 : Évolution au cours de la grossesse de la concentration de l'AFP dans le sérum fœtal, (3a), le liquide amniotique (3b), et le sérum maternel (3c).

Cette réduction serait due à un passage transplacentaire ralenti plutôt qu'à une production fœtale réduite (5).

- L'élévation de l'AFP sérique maternelle au-delà de 2,4 MoM est un signe d'alerte biologique de malformation du tube neural et parfois d'un défaut de fermeture de la paroi abdominale (fig. 4).

d) Méthodologie

La molécule d'AFP est stable dans les conditions usuelles de fonctionnement des laboratoires (conservation à - 20° ou à + 4° C).

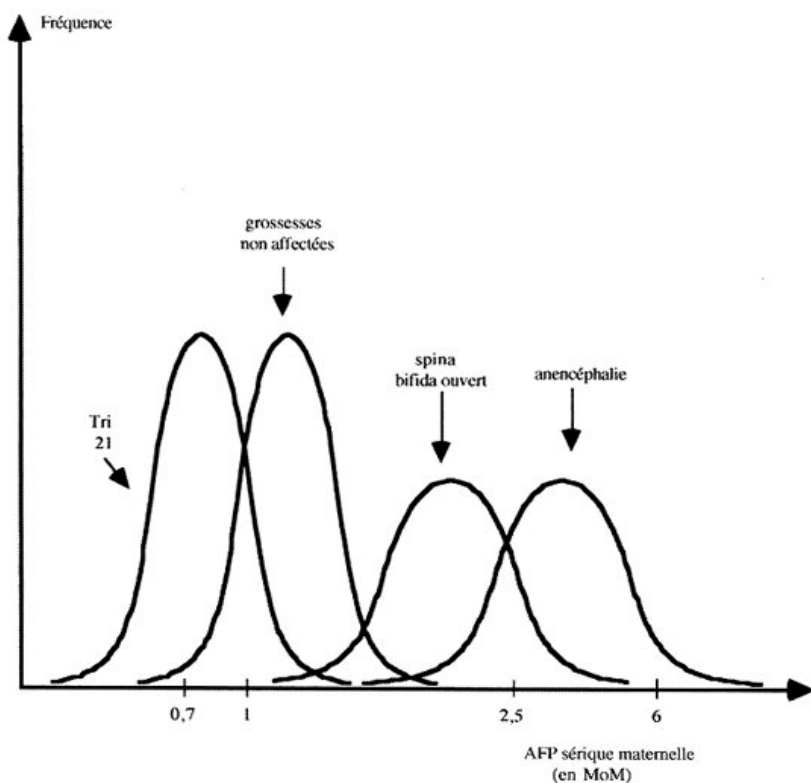


Figure 4 : Distribution des concentrations de l'AFP dans les grossesses normales, les grossesses en présence de trisomie 21, de spina bifida ouvert ou d'anencéphalie.

II.2- L'estriol non conjugué (uE3) (10,11,12)

a) Origine

L'estriol non conjugué est un stéroïde d'origine strictement fœtoplacentaire ; il provient du sulfate de dihydroépiandrostérone (S - DHA) sécrété par la surrénale fœtale, hydroxylé ensuite en position 16 dans le foie du fœtus, puis désulfaté et aromatisé en estriol dans le placenta (fig. 5).

b) Physiologie sommaire

Une fois dans le compartiment maternel, le stéroïde subit une conjugaison au niveau du foie. Une petite proportion (voisine de 10 %) reste sous forme libre. De surcroît, près de 70 % des formes libres et conjuguées de l'estriol se lient à la SHBG (globuline vectrice des hormones sexuelles). Seule la fraction non liée à une protéine possède une activité biolo-

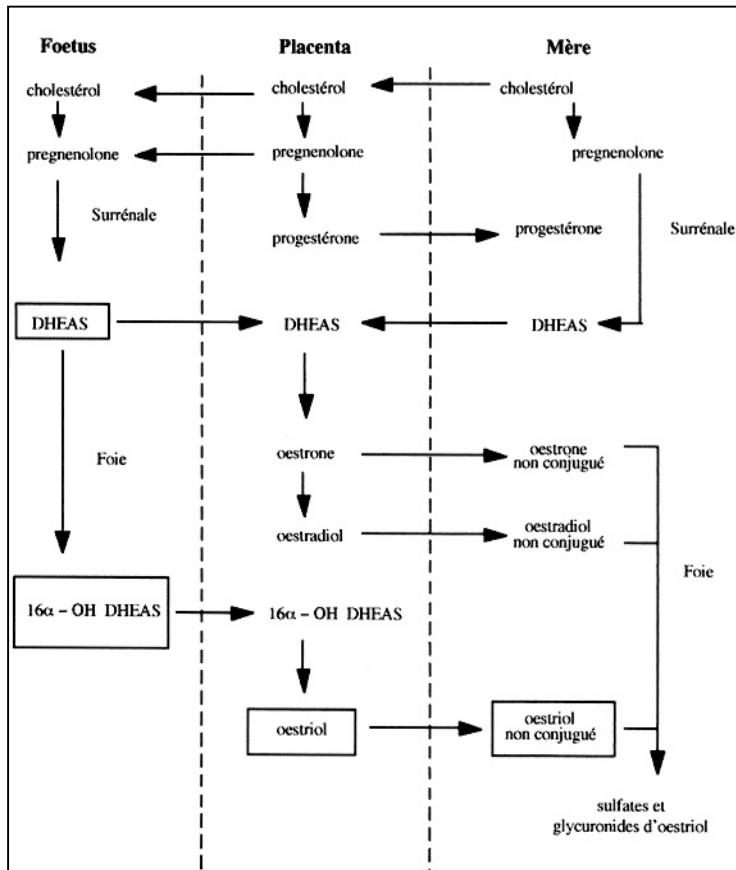


Figure 5 : Mécanisme de production des oestrogènes dans l'unité placentaire.

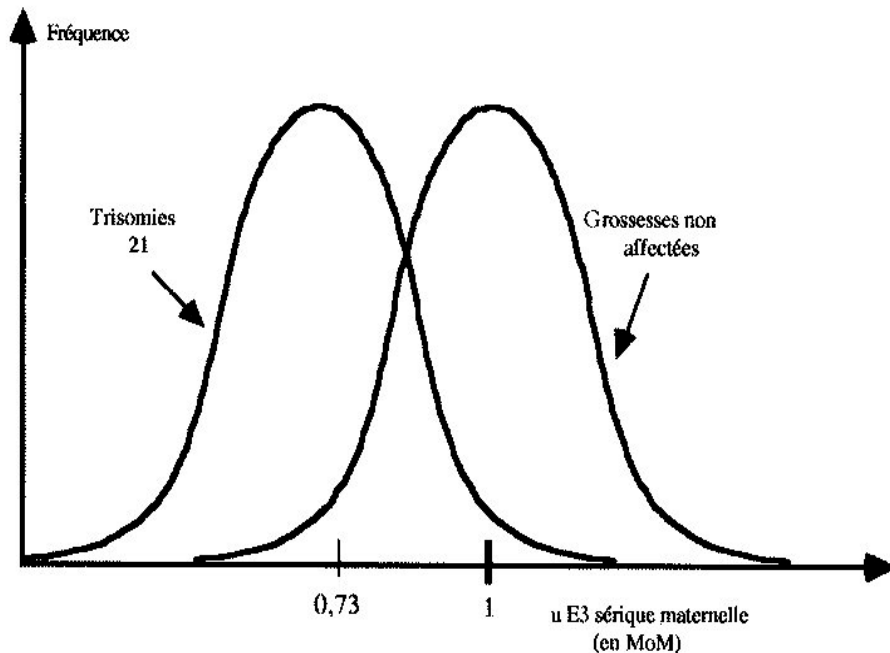


Figure 6 : Distribution des concentrations d'uE₃ dans les grossesses normales et les grossesses avec trisomie 21.

gique. Il y aurait une variation circadienne de la concentration sérique d'uE3, les valeurs matinales étant inférieures de 15 % aux valeurs de l'après-midi (12).

Pendant la grossesse, la concentration d'estriol augmente rapidement. Au début du 2^e trimestre, on observe des concentrations (distribution log. normale) allant de 4 nmol/l à 15 semaines à 6,3 nmol/l à 18 semaines (valeurs obtenues avec les réactifs AMERLEX®). À terme, les concentrations peuvent atteindre 40 nmol/l.

c) Intérêt du dosage pour la trisomie 21

Les concentrations d'uE3 en cas de trisomie 21 sont abaissées : 0,73 MoM (11) (fig. 6).

d) Méthodologie

Il s'agit du dosage d'un stéroïde présent à faible concentration, il faut donc être particulièrement attentif à la reproductibilité.

II.3- L'hormone chorionique gonadotrope et sa sous-unité bêta

Le laboratoire dispose d'autres marqueurs plus discriminants pour apprécier l'existence d'un risque accru de trisomie 21, l'hCG intacte (ou dimérique) et la sous-unité bêta libre.

L'élévation de la concentration d'hCG dans le sang de mères porteuses d'un fœtus trisomique a été signalée en 1987 par Bogart (13).

C'est en 1990 que Macri (14) témoigne de l'intérêt de l'emploi de la sous-unité β libre pour atteindre une meilleure sensibilité.

a) Origine

L'hCG est sécrétée au cours de la grossesse par le syncytiotrophoblaste mais elle peut être sécrétée également par des tissus trophoblastiques tels la môle hydatiforme et par des tissus malins d'origine embryologique choriale (chorioépithéliome) ou par des tumeurs ectopiques non trophoblastiques (cancer du poumon, sein, appareil digestif). Les deux sous unités α et β sont synthétisées à partir d'ARNm différents. Le facteur limitant est représenté par la sous-unité β son taux évolue de façon semblable à celui de l'hCG totale. (La sous-unité α est synthétisée en excès d'une manière progressive tout au long de la grossesse et atteint son maximum à la fin de celle-ci.)

b) Structure et physiologie sommaire

L'hCG est formée par l'association non covalente de deux sous-unités dénommées alpha (hCG α .) et bêta (hCG β). Les sous-unités non combinées ou libres sont présentes dans certaines situations physiopathologiques. Le produit de dégradation principal est le fragment β -core (hCG β cf).

L'hCG présente une parenté structurale importante avec trois hormones hypophysaires, l'hormone lutéotrope (LH), l'hormone folliculotrope (FSH) et l'hormone thyroïdienne (TSH). La sous-unité α commune à toutes les hormones de cette famille, comporte 92 acides aminés et deux chaînes N-oligosaccharidiques. La sous-unité β assure la spécificité d'action ; elle est composée de 145 acides aminés dont une séquence de 24 résidus carboxy-terminaux (CTP ou « Carboxyl Terminal Portion ») qui est absente sur la hLH β . Elle possède 6 chaînes glucidiques dont 4 chaînes O-glycosidiques, situées sur la partie carboxy-terminale. L'association des deux sous-unités est indispensable pour l'expression

de l'activité biologique de l'hormone (fig. 7). La structure tridimensionnelle de l'hCG a été établie très récemment (17).

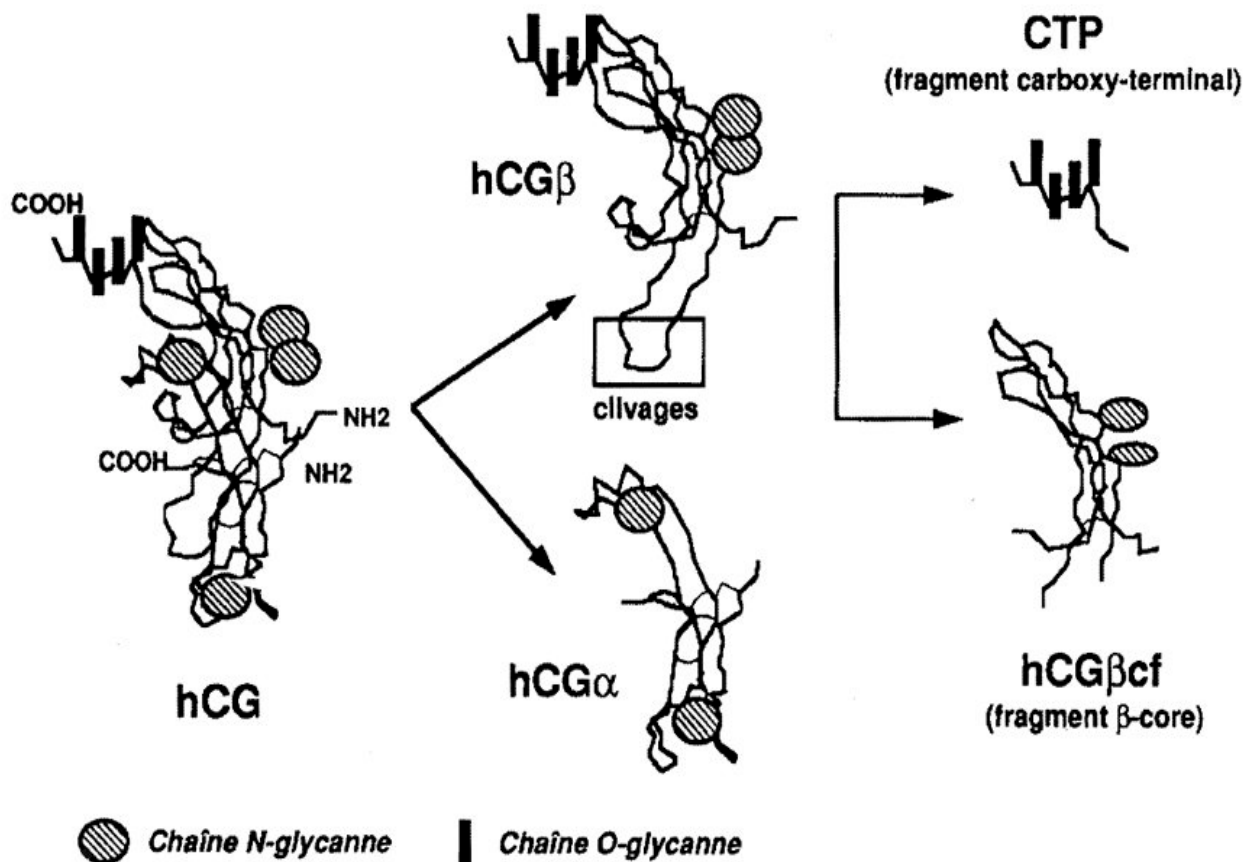


Figure 7 : Représentation schématique des formes moléculaires de l'hormone chorionique gonadotrope (figure empruntée à J.M. Bidart, 20).

Des taux sériques faibles d'hCG dimérique (inférieurs à 10 mUI/ml soit environ 1 000 pg/ml) sont détectables chez 59 % des sujets sans pathologie décelable. Des taux sériques d'hCG α libre (inférieurs à 3 000 pg/ml) et d'hCG β libre (toujours inférieurs à 100 ng/ml) sont détectables chez environ 70 % des sujets normaux (17).

L'hCG dimérique est l'objet d'un polymorphisme important ce qui explique la variabilité de sa masse moléculaire (40-45 kDa). Les formes moléculaires résultent de la microhétérogénéité des chaînes glucidiques qui représentent 30 % de la masse d'hCG (19-20).

Environ 80 % de l'hCG est métabolisé par le foie et le rein ; 20 % est retrouvé à l'état non dégradé dans l'urine. La demi-vie sérique de l'hCG est d'environ 24-36 h ; son élimination peut être décomposée en deux phases, une rapide (t_{1/2} = 5-6 h) et l'autre plus lente (t_{1/2} > 24 h). Les demi-vies des sous-unités hCG α et hCG β sont respectivement égales à 2 h (t_{1/2} = 13 min et t_{1/2} = 1,3 h) et 3-4 h (t_{1/2} = 40 min et t_{1/2} = 39 h). Les clairances urinaires de l'hCG et de ses sous-unités sont l'objet de légères variations interindividuelles.

Le rôle physiologique essentiel de l'hCG est de stimuler le corps jaune pour maintenir la production d'hormones stéroïdiennes au début de la grossesse.

Le taux plasmatique de l'hCG intacte augmente rapidement après la conception pour atteindre sa valeur maximale vers la 9^e semaine de gestation ; il diminue ensuite rapidement pour se stabiliser aux environs de la 20^e semaine et rester sensiblement constant jusqu'à la fin de la grossesse (fig. 8).

Les concentrations d'hCG intacte varient largement d'une patiente à l'autre. Le tableau III fournit les valeurs en fonction des percentiles et des semaines de gestation (valeurs du laboratoire des hormones et des marqueurs, Hôpital Cochin).

Tableau III : Concentrations d'hCG intacte en fonction de la durée de gestation .
(mU/ml) (grossesses normales)

Percentiles	Semaines d'aménorrhée			
	15 ^e	16 ^e	17 ^e	18 ^e
1 ^{er}	10099	8012	6561	5647
5 ^e	12850	11975	9417	10172
10 ^e	16794	14610	11765	11340
25 ^e	24087	21712	16900	14725
50 ^e	34750	31265	24550	21200
75 ^e	50443	43325	34300	32312
80 ^e	56840	45875	37145	34290
90 ^e	71420	59840	42375	41090
95 ^e	90365	66532	50745	49643

Le taux de la sous-unité β hCG libre évolue parallèlement à l'hCG intacte (fig.9), avec une différence notable : la concentration, exprimée en mU, est environ 1 000 fois inférieure.

c) Intérêt des dosages

- hCG intacte

La médiane des concentrations de l'hCG dimérique dans le cas des grossesses affectées est voisine de 2,1 multiples de la médiane observée avec les grossesses normales. Le mécanisme de ce phénomène n'est pas encore élucidé (26).

- Sous-unité β hCG libre

La médiane des concentrations en cas de trisomie atteint 2,4 fois la valeur de la médiane normale (28,32).

d) Méthodologie

- Standard et matériaux de référence (20)

En 1975, une préparation d'hCG (CR 119) a été proposée comme matériel de référence international pour les immunoessais (1st IRP) en remplacement du second standard international (2nd IS), utilisé pour les essais biologiques et contenant moins de 20 % d'hCG pure. En 1986, le standard 1st IRP est devenu le 3rd IS, distribué sous le code 75/537 et contenant 70 % d'hCG purifiée ; les sous-unités libres, obtenues à partir de la même préparation, sont codées 75/569 pour l'hCG α et 75/551 pour l'hCG β . Toutes ces préparations contiennent des fragments et des formes clivées dont l'immunoréactivité est variable. Des

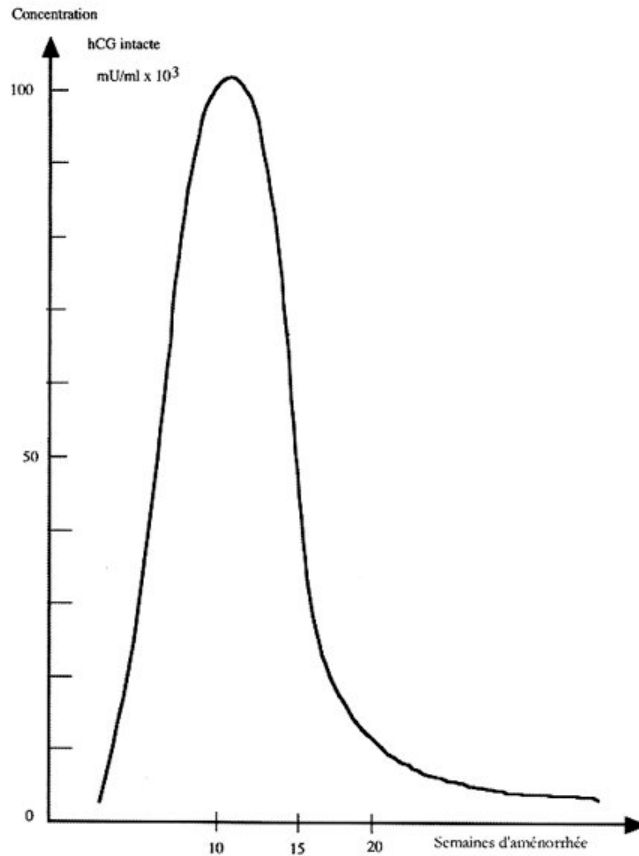


Figure 8 : Évolution de l'hCG intacte pendant la grossesse.

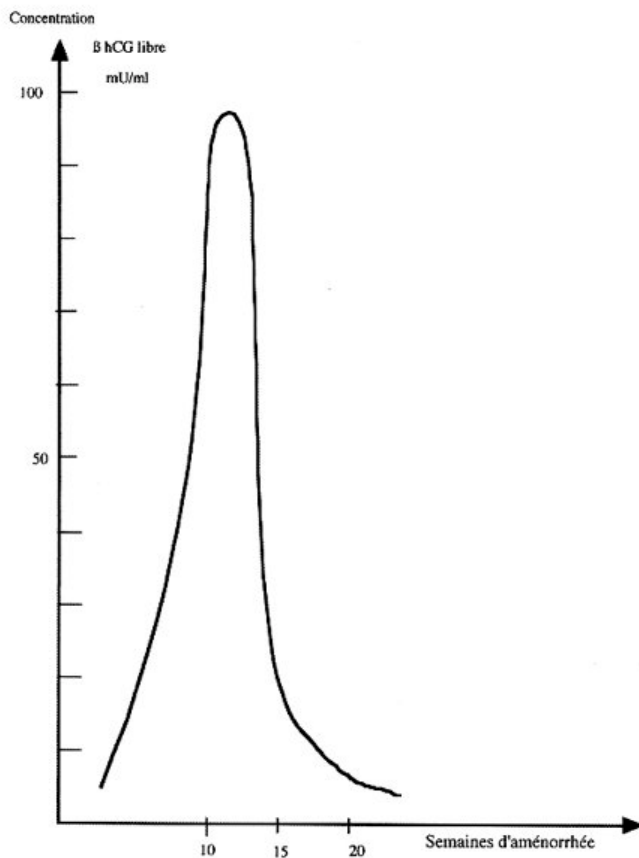


Figure 9 : Évolution de la sous-unité β hCG libre pendant la grossesse.

molécules d'origine recombinante (hCG et sous-unités α et β libres) et les principales formes moléculaires de l'hCG (hCGc, hCG β c et hCG β cf) seront bientôt proposées comme matériaux de référence.

La relation entre masse et unité est la suivante :

- pour l'hCG intacte : $1 \text{ ng} = 9,2 \text{ mU}$.

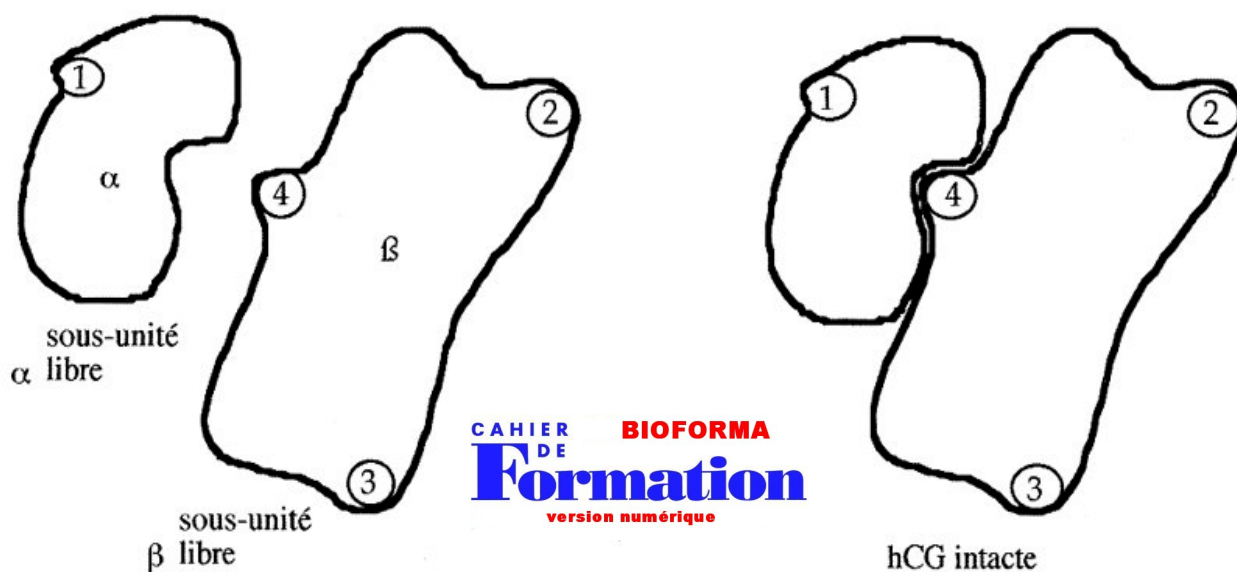
- pour la β hCG libre : $1 \text{ ng} = 1 \text{ mU}$.

• hCG intacte

La molécule d'hCG intacte est stable dans le sang dans la pratique courante du laboratoire.

Les valeurs élevées nécessitent le plus souvent une dilution du plasma avant l'analyse, au X en général, compte tenu de l'intervalle de mesure de la gamme d'étalonnage.

NB . Certains réactifs dosent en fait à la fois l'hCG intacte et la β hCG libre en raison de particularités de reconnaissance de certains domaines moléculaires (fig. 10).



Domaine d'accrochage		Composé dosé
1er anticorps	2e anticorps signal	
2 ou 3	1	hCG intacte
3	2	hCG intacte + β libre
4	2 ou 3	β libre

Le premier anticorps accroché à une phase solide, extrait l'antigène à doser; la quantité du 2e anticorps fixé sur 1'antigène est proportionnelle à la concentration de celui-ci.

Figure 10 : Principe de dosage de l'hCG intacte et de la sous-unité β libre.

- Sous-unité β libre

Les concentrations circulantes de la sous-unité β hCG libre contrairement à l'hCG intacte, sont mesurables sans dilution préalable de l'échantillon. Par contre, il semble qu'on doive prendre en considération la production de sous-unités libres à partir d'hCG intacte lors de la conservation du sang total. Bien que cette observation soit l'objet de controverses, (33 à 35), des augmentations de près de 10 % après 24 heures de conservation ont été observées (20 % après 48 heures) (36) (fig. 11).

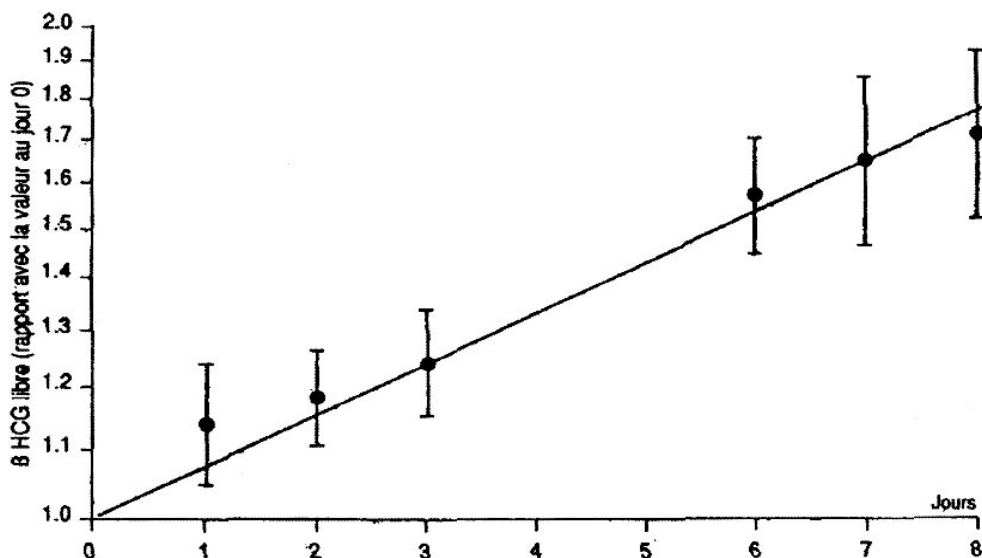


Figure 11 : Variations de la concentration de hCG libre dans le sang total conservé à température du laboratoire en fonction de la durée de conservation.

II.4- La protéine plasmatique A associée à la grossesse (PAPP-A)

a) Origine

La PAPP-A est produite par le trophoblaste (37). C'est une α_2 glycoprotéine de 750 kDA, contenant 1 547 aminoacides et 16 atomes de zinc par molécule.

b) Physiologie sommaire

La PAPP-A est un inhibiteur puissant et spécifique de l'élastase granulocytaire (38) ; elle pourrait jouer un rôle protecteur du fœtus vis-à-vis du système immunitaire maternel (37).

La PAPP-A peut être détectée dans le sang maternel à partir de la 5^e semaine après le début de la grossesse. La concentration sérique augmente rapidement pendant le premier trimestre (temps de doublement voisin de 6 jours) (tableau IV) (39,40).

Tableau IV : Concentration médiane de PAPP-A (U/l) pour les grossesses normales en fonction de l'âge gestationnel

Semaines d'aménorrhée	Médiane
5	46
6	98
7	197
8	376
9	677
10	1200
11	1850
12	2800
13	4010
14	5430
15	6930
16	8360
17	9520
18	10240
19	10400
20	9980

c) Intérêt de la PAPP-A

La concentration plasmatique maternelle de PAPP-A est très abaissée en cas d'anomalie chromosomique (39 à 43) (fig. 12).

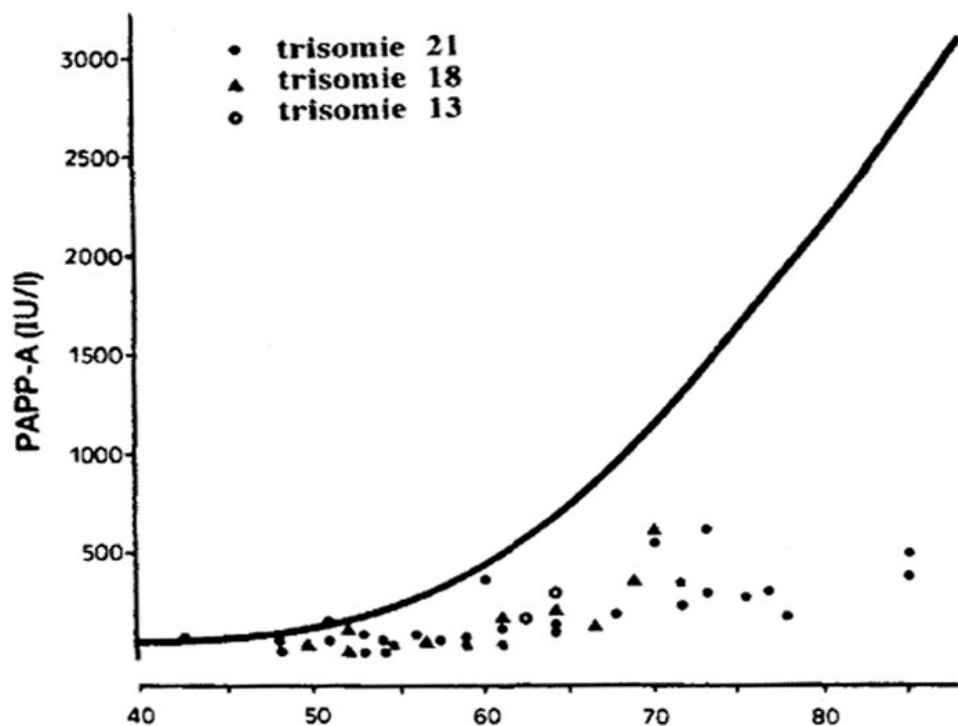


Figure 12 : Concentrations de la PAPP-A dans le sang maternel en cas d'anomalies chromosomiques. (La courbe correspond à la médiane observée pour les grossesses normales) (43).

Exprimé en MoM, l'abaissement est plus important lorsque les dosages sont effectués plus précocement (tableau V).

Tableau V : Concentrations de PAPP-A (en MoM) au cours du premier trimestre en cas de trisomie 21 (39)

Semaines d'aménorrhée	Concentrations
7-12	0,3
8-12	0,24-0,31
9-11	0,33
10-11	0,47
10-13	0,53
12-13	0,85

d) Méthodologie

La spécificité des anticorps utilisés pour le dosage de PAPP-A, de même que la nature des standards, joue un rôle capital. Les résultats obtenus avec les réactifs de première génération (anticorps polyclonaux reconnaissant notamment l' α_2 macroglobuline, la protéine SP1 et l'haptoglobine) ne sont pas comparables (43, 44).

II.5- Inhibine A (dimère) (45-48)

L'inhibine est un membre de la superfamille des transforming growth factor bêta (TGF β). Elle est caractérisée par sa capacité de suppression de la sécrétion de FSH.

Les dimères rencontrés sont composés d'une sous-unité α et de l'une des deux sous-unités β existantes. Il en résulte qu'on peut observer de l'inhibine A dimère (α - β A) et de l'inhibine B (α - β B). Seule l'inhibine A serait présente dans le sérum des femmes enceintes.

À partir de 1995, la standardisation des réactifs a permis de montrer que la concentration d'inhibine A est significativement plus élevée dans le groupe des trisomies 21 que dans le groupe des témoins (49-56).

NB. Les résultats sont exprimés en pg/ml (ou en unités arbitraires par ml) (53).

II.6- β core (urinaire) (57)

C'est le produit de dégradation de l'hCG β libre. Éliminé dans l'urine, il présente une grande stabilité.

Ce dosage urinaire présente comme avantages :

- une sensibilité excellente à partir de la 15^{ème} semaine d'aménorrhée
- une adaptation intéressante au dépistage de masse

Par contre, on doit corriger les valeurs de concentration en fonction de la créatinine urinaire.

Après avoir passé en revue les différents marqueurs, nous allons faire le point sur les performances de ces marqueurs, utilisés seuls ou en association.

III.1- Analyses effectuées pendant le 2e trimestre

Certaines caractéristiques essentielles des marqueurs en matière de pouvoir discriminant ont été rassemblées dans ce paragraphe.

a) *Alphafœtoprotéine*

- Pour la trisomie 21, en limitant le taux d'amniocentèse à 5 % de l'ensemble des grossesses explorées, le taux de détection obtenu avec l'AFP est voisin de 15 %. L'âge maternel est plus discriminant (30 %) ; avec l'âge maternel et le dosage d'AFP, le taux de détection ne dépasse pas 34 % (60).
- Les défauts de fermeture de la gouttière neurale sont relativement peu fréquents en France où leur incidence moyenne est de 1 pour mille (cette fréquence augmente avec le risque de récurrence et dans certaines régions) (61).
- Le calcul de risque devrait tenir compte de différents facteurs (voir tableau VI).

Tableau VI : Influence de différents facteurs sur les concentrations de l'AFP sérique maternelle

Facteur	Variations observées sur la concentration C
Poids	C diminue quand la masse corporelle augmente (hémodilution)
Race	C plus élevée pour les races noire et jaune (62)
Diabète insulino-dépendant	C légèrement diminuée : 0,91 MoM (63)
Tabagisme	effet variable (64)
Jumeaux	C augmentée
Amniocentèse	C augmentée (65)
Retard de croissance, hypertension, gravidique	C augmentée (66)
Trisomie 18	C diminuée : 0,53 MoM (67)

b) *Estriol non conjugué*

Le taux de détection des trisomies 21 obtenu avec l'uE3 et l'âge maternel atteint 40 % (60) (pour un taux d'amniocentèse de 5 %).

c) *hCG intacte et βhCG libre*

En limitant le taux d'amniocentèse à 5 %, le taux de détection obtenu est voisin de :

- 40 % avec l'hCG intacte
- 45 % avec la βhCG libre

En combinant l'âge maternel à la mesure de l'un des marqueurs, on obtient des taux de détection supérieurs.

Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats d'hCG devrait tenir compte des observations rassemblées dans le tableau VII.

Tableau VII : Influence de différents facteurs sur les concentrations de l'hCG sérique maternelle (68, 69, 86).

Facteur	Variations observées sur la concentration C
Poids	C diminue quand la masse corporelle augmente
Race	C plus élevée pour la race noire
Jumeaux	1,8 à 2,4 MoM
Sexe du fœtus après 18 semaines	C (fille) supérieure à C (garçon)
Tabagisme	C diminue
Amniocentèse	C inchangée
Retard de croissance, hypertension	C augmente
Menace d'avortement	C diminue
Diabète	C stable ou diminue légèrement
Trisomie 18	C nettement abaissée statistiquement (0,3 MoM)

En ce qui concerne la β hCG libre, de nombreux auteurs s'accordent pour lui reconnaître une meilleure efficacité globale de détection de la trisomie par rapport à l'hCG intacte. Un autre aspect positif est représenté par un gain de sensibilité pour des tests pratiqués plus précocement ou chez des patientes d'âge inférieur à 30 ans (28).

d) Association de marqueurs

Le tableau VIII résume les taux de détection de trisomie 21 en limitant à 5 % le pourcentage de patientes soumises à une amniocentèse, pour des analyses effectuées entre la 15^e et la 18^e semaine.

L'emploi de l'estriol non conjugué ($u E_3$) comme marqueur supplémentaire dans le « triple test » est controversé (12, 70). En effet, estriol et AFP ne sont pas des variables indépendantes, puisque ces molécules ont la même origine (fœtus) ; par ailleurs, l'imprécision (traduite par les coefficients de variation analytique) à partir d'une 3^e analyse est telle que l'intérêt pratique devient sujet à caution (71).

Tableau VIII : Taux de détection de la trisomie 21 en fonction des modalités retenues pour l'emploi des marqueurs sériques (obtenu pour un taux d'amniocentèse limité à 5 % de l'ensemble des grossesses explorées entre 14 et 17 semaines) (28, 86)

Modalité	Taux de détection %	Références complémentaires
âge maternel seul	28-30	
AFP	7-10	60
AFP + âge maternel	34	
uE ₃	18	
uE ₃ + âge maternel	40	60
hCG intacte	38-40	
hCG intacte + âge maternel	50	
hCG + AFP + âge maternel	55	72
hCG + AFP + uE ₃ + âge maternel (« triple test »)	61	
βhCG libre	45	
βhCG libre + âge maternel	59	
βhCG libre + AFP + âge maternel	58-66	72

Analysés en association avec l'âge de la mère, les taux d'hCG intacte ou de βhCG libre sont à considérer en priorité. L'équipe optant pour la β libre doit se prémunir contre les risques de dégradation de l'hormone intacte dans un prélèvement de sang conservé sans précautions.

Le dosage d'alphafœtoprotéine doit faire partie du protocole de détermination du risque car il améliore la sensibilité et la spécificité du test.

L'ajout du dosage d'estriol nous paraît apporter peu compte tenu du surcoût financier et de la charge de travail.

L'intérêt de la PAPP-A doit être considéré comme nul pour une utilisation au cours du 2^e trimestre (73).

En conclusion, la meilleure association de marqueurs sériques pour le dépistage de la trisomie 21 est βhCG libre + AFP. L'efficacité de détection à 15 semaines est meilleure qu'à 18 semaines ; pour un âge maternel inférieur à 24 ans, le taux de détection de la trisomie serait nettement moins bon.

III.2- Analyses effectuées pendant le premier trimestre

Il ressort des différentes études publiées (37 à 43) que la PAPP-A pourrait devenir un marqueur de choix pour la détermination d'un risque de trisomie 21 pour des grossesses de 8 à 12 semaines. Le taux de détection (PAPP-A seule) atteindrait 55 % pour un taux de faux positifs de 5 % (41) ; il pourrait atteindre, associé à l'âge maternel, 62 à 71 % selon les auteurs (39, 74).

Dans une étude portant sur 29 cas (40), deux patientes seulement présentaient une concentration voisine de 1 MoM, les 27 autres entre 0,11 et 0,77 (étude effectuée entre la 6^e et la 12^e semaine).

Pour les anomalies autres que la trisomie 21 (trisomie 18 et trisomie 13 notamment), les concentrations sont également abaissées (0,09 à 0,71) (analyses entre la 7^e et la 10^e semaine).

L'association d'un autre marqueur à cette période de gestation, pour améliorer l'efficacité, doit tenir compte des remarques suivantes :

- l'alphafœtoprotéine est sans intérêt à ce stade de la gestation pour la détection d'un défaut de fermeture du tube neural,
- pour la détection de la trisomie 21, il est intéressant de comparer les performances des marqueurs connus du deuxième trimestre (tableau IX) (42).

Tableau IX : Concentration en MoM des marqueurs dits « du 2^e trimestre » analysés à un stade plus précoce (en présence d'un fœtus trisomique)

Marqueur	Valeur en MoM	
	après 15 semaines	avant 15 semaines
AFP	0,74	0,73
uE ₃	0,73	0,68
hCG	2,04	1,19
βhCG libre	2,30	2,04

À partir de ce tableau, il est clair que seule la βhCG libre est « candidate » au dépistage en fin de premier trimestre (75-76). La combinaison βhCG libre + PAPP-A augmenterait le taux moyen de détection à 80 % (39). À partir de ces quelques données, la décision de recourir aux marqueurs sériques doit tenir compte de plusieurs considérations

- la PAPP-A, performante jusqu'à la 10^e semaine (77, 42), l'est moins à la 12^e semaine, qui correspond en France à une période favorable pour une prise de sang (0,29 MoM pour 5-10 semaines contre 0,42 MoM pour 11-14 semaines) ;
- les données sur la concentration de βhCG libre à cette période plus précoce sont encore fragmentaires ;
- une incertitude existe sur la capacité des logiciels « du 2^e trimestre » à résoudre les calculs de risque pour le 1^{er} trimestre ;
- la difficulté de réaliser une amniocentèse avant la 13^e semaine obligerait à recueillir du tissu fœtal à l'aide d'une biopsie des villosités chorales ;
- l'importance des variations de concentrations de PAPP-A et de βhCG libre autour de la 12^e semaine exige une datation extrêmement précise de l'âge gestationnel ;
- la question se pose de savoir si la détection précoce ne va pas concerner des nombreux fœtus non viables (non repérés lors d'analyses effectuées après 15 semaines) ;
- une coordination encore plus étroite s'imposerait entre le laboratoire des marqueurs et l'unité d'échographie.

■ IV. LA VIE AU QUOTIDIEN DANS LE LABORATOIRE

En septembre 1998, environ 60 laboratoires avaient reçu l'agrément de la D.G.S. De surcroît, les analyses font l'objet d'un encadrement, qu'il s'agisse des réactifs et du logiciel.

Le biologiste doit :

- utiliser un couple (réactif + logiciel) enregistré par l'Agence du Médicament
- doser au moins 2 marqueurs dont l'hCG
- calculer un risque et l'interpréter par rapport au risque seuil fixé.

Les logiciels jouent un rôle majeur dans le calcul du risque. C'est à ce titre que leurs performances doivent faire l'objet d'une analyse attentive, autant du biologiste que de l'Agence du Médicament qui a reçu la mission de valider ces outils indispensables (voir Annexes).

Par ailleurs, des règles strictes concernent l'archivage :

- Prescripteurs

Conservation de l'original de déclaration de consentement de la patiente

- Biologiste

Conservation des sérums 1 an à - 18 °C

Conservation de l'attestation signée par le prescripteur : 5 ans

des résultats d'analyses et les comptes rendus pour risque élevé

des résultats des analyses exécutées pour les besoins du contrôle national de qualité.

Le biologiste doit

1. S'assurer de la validité de la feuille de demande
2. Veiller à obtenir les données indispensables (au moment du prélèvement)
 - âge de la patiente
 - âge gestationnel
 - poids, gémellité
 - données diverses pouvant être utiles
3. Respecter les procédures d'assurance de qualité (voir Annexes)
4. Préparer les feuilles de résultats et les comptes rendus pour risque élevé
5. Interpréter les résultats
6. Archiver les documents réglementaires
7. Conserver les sérums

L'interprétation des résultats ne concerne a priori que le risque de trisomie 21 fœtale. Cependant, les analyses biochimiques sont susceptibles de fournir des données pouvant alerter le clinicien dans différentes situations (84) : défaut de fermeture du tube neural, trisomie 18, souffrance fœtale.

Le nombre de paramètres maternels (autres que l'âge) pouvant intervenir dans le calcul du risque est important :

poids (rôle de la dilution)
origine géographique : Antilles, Asie
diabète insulino-dépendant
grossesse gémellaire (85)
tabagisme
naissance d'un premier enfant trisomique

Un numéro spécial de J. Med. Screen. fait le point sur l'importance relative de ces paramètres (86). Les nouveau-nés issus de la PMA ont fait également l'objet d'études (87).

Suivi du dépistage dans l'établissement de soins

Ce suivi implique une étroite collaboration entre les cliniciens, le cytogénéticien et le biologiste. Il s'agit de vérifier que les objectifs sont réalisés à partir des issues de grossesses et des résultats des caryotypes.

1. Nombre de grossesses classées à tort dans le groupe à risque (faux positifs)
2. Nombre de trisomies 21 dépistées (vrais positifs)
3. Nombre de trisomies 21 non dépistées (faux négatifs)

Conclusion

Le diagnostic de certitude de la trisomie 21 fœtale repose sur le caryotype fœtal réalisé sur des prélèvements invasifs (amniocentèse ou choriocentèse).

Les analyses de biochimie sur le sang maternel, si elles représentent un progrès réel en matière de santé publique, ne peuvent prétendre à d'excellentes performances en matière de sensibilité puisque près du tiers des patientes testées et porteuses d'un fœtus trisomique ne se verra pas affectée d'un risque élevé.

Quant à la spécificité, elle est fixée par voie réglementaire, car on a jugé que 5 % de faux positifs correspondait à une proportion acceptable compte tenu des fausses couches provoquées par les amniocentèses induites.

La place des marqueurs sériques doit maintenant se discuter en fonction des performances de l'échographie.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- FERGUSON-SMITH M.A., PATES J.R.W., Maternal age specific rates for chromosomal aberrations and factors influencing them. Report of a collaborative european study on 52,965 amniocentesis, *Prenat. Diagn.*, 1984, 4, S 1, 5-44.
- 2- ELIAS S., SIMPSON J.L., Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal blood, in: *Screening for Down's syndrome*, Ed. Grudzinskas J.G., Chard T., Chapman M. and Cuckle H., Cambridge Press Univ., Cambridge, 1994, 193-210.
- 3- VECCHIO T.J., Predictive value to a single diagnostic test in unselected populations, *N. Engl. J. Med.*, 1966, 274, 21, 1171-1173 .
- 4- CUCKLE H.S., WALD N.J., THOMPSON S.C., 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.
- 5- CUCKLE H.S., WALD N.J., LINDENBAUM R., Maternal serum alpha-foetoprotein measurement: a screening test for Down's syndrome, *Lancet*, 1984, II, 926-929.
- 6- MERKATZ I.R., NITOWSKI H.M., MACRI J.N., JOHNSON W.E., An association between low maternal serum alpha-foetoprotein and fetal chromosome abnormalities, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1984, 133, 119-125.
- 7- BREMME K., ENROTH P., NILSSON B., On the use of AFP and prolactin in prenatal diagnosis of fetal abnormalities in early pregnancy, *Int. J. Gynecol. Obst.*, 1982, 20, 293-300.
- 8- KRONQUIST K.E., DREAZEN E., KEENER S.L., Reduced fetal hepatic alphafoetoprotein levels in Down's syndrome, *Prenat. Diagn.*, 1990, 10, 739-751.
- 9- KNOTT P.D., CHAN B., WARD R.H.T., CHARD T., GRUDZINSKAS J.G., PETROU M., MODEL B ., Changes in circulating alpha-foetoprotein and hCG following chorionic villus sampling, *Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.*, 1988, 27, 277-281.
- 10- LEYMARIE P., LEPORRIER N., HERROU M., Intérêt du dosage de l'estriol pour le diagnostic anténatal de la trisomie 21, *Immunoanal. Biol. Spec.*, 1992, 33, 49-51.
- 11- WALD N.J., CUCKLE H.S., DENSEM J.W., NANCHAHAL K., CANICK J.A., HADDOW J.E., KNIGHT G.J., PALOMAKI G.E., Maternal serum unconjugated oestriol as an antenatal screening test for Down's syndrome, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1988, 95, 334-341.
- 12- SPENCER K., Is the measurement of unconjugated oestriol of value in screening for Down's syndrome, in: *Screening for Down's syndrome*, Ed. Grudzinskas J.G., Chard T., Chapman M. and Cuckle H., Cambridge Univ. Press., 1994, 141-162.
- 13- BOGART M.H., PANDIAN M.R., JONES O.W., Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin in pregnancies with fetal chromosome abnormalities, *Prenat. Diagn.*, 1987, 7, 623-630.
- 14- MACRI J.N., KASTURI R.v., KRANTZ D.A., Maternal serum Down syndrome screening: free beta protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1990, 163, 1248-1253.

- 15- COLE L.A., KARDANA A., BIRKEN S., The isomers, subunits and fragments of hCG, in: Structure function relationship of gonadotropins, Bellet D., Bidart J.M. (Eds), Raven Press, New York, 1989, 59-80.
- 16- BOUSFIELD G.R., PERRY W.M., WARD D.N., Gonadotropins - chemistry and biosynthesis, in: The physiology of reproduction, Second Edition, Knobil E., Neil J.D., (Eds) Raven Press, New York, 1994, 1749-1792.
- 17- WU H., LUSTBADER J.W., LIU Y., CANFIELD R.E., HENDRICKSON W.A., Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein, Structure, 1994, 2, 545-558.
- 18- JAMESON J.L., HOLLENBERG A.N., Regulation of chorionic gonadotropin gene expression, Endocrine Rev., 1993, 14, 203-221.
- 19- BIDART J.M., BELLET D., Human chorionic gonadotropin: molecular forms, detection, and clinical implications, Trends. Endocrinol. Metab, 1993, 4, 285-291.
- 20- BIDART J.M., L'hormone chorionique gonadotrope et ses formes moléculaires, Immunoanal, Biol. Spec., 1995, 10, 6, 341-346.
- 21- COLE L.A., Multiple hCG related molecules, in: Screening for Down's syndrome. Ed. Grudzinskas J.G., Chard T., Chapman M. and Cuckle H., Cambridge Univ. Press, Cambridge 1994, 119-140.
- 22- COLE L.A., KARCANA A., Discordant results in human chorionic gonadotropin assays, Clin. Chem., 1992, 38, 263-270.
- 23- STENMAN U.H., BIDART J.M., BIRKEN S., MANN K., NISULA B., O'CONNOR J., Standardization of protein immunoprocures-choriogonadotropin (CG), Scand J. Clin. Lab. Invest., 1993, 53, 42-78.
- 24- O'CONNOR J., BIRKEN S., LUSTBADER J.W., KRICHEVSKY A., CHEN Y., CANFIELD RE, Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements, Endocr. Rev., 1994, 15, 650-683.
- 25- BIDART J.M., BIRKEN S., BERGER P. KRICHEVSKY A., Immunochemical mapping of hCG and hCG-related molecules, Scand J. Clin. Lab. Invest., 1994, 53, 118-136.
- 26- CHARD T., GRUDZINSKAS J.G., The endocrinology of the fetoplacental unit in the second trimester of pregnancy, in: The Embryo, Chapman M., Grudzinskas J.G. and Chard T. (Eds), Springer Verlag, London, 1991, 209-226.
- 27- GRAHAM G.W., CROSSLEY J.A., AITKEN D.A., CONNOR J.M., Variations of pregnancy specific beta-1-glycoprotein in maternal serum from chromosomally abnormal pregnancies, Prenat. Diagn., 1992, 12, 505-512.
- 28- SPENCER K., COOMBES E.J., MALLARD A.S., WARD M.A., Free beta human choriogonadotropin in Down's syndrome screening: a multicenter study of its role compared with other biochemical markers, Ann. Clin. Biochem., 1992, 29, 506-518.
- 29- SPENCER K., COOMBES ED.J., MALLARD A.S. and MILFORD WARD A., Free βhCG in Down's syndrome screening: a multicentre study of its role compared with other biochemical markers, Ann. Clin. Biochem., 1992, 29, 506-518.
- 30- SPENCER K., CARPENTER P., Prospective study of prenatal screening for Down's syndrome with free βhCG, BMJ 1993, 307, 764-768.

- 31- WALD N., DENSEM J., STONE R., CHENG R., The use of free β hCG in antenatal screening for Down's syndrome, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1993, 100, 550-557.
- 32- MACRI J.N., SPENCER K., GARVER K. BUCHANAN P.D., SAY B., CARPENTER N.J., MULLER F., BOUE A., Maternal serum free β hCG screening: results of studies including 480 cases of Down's syndrome, *Prenat. Diagn.*, 1994, 14, 97-103.
- 33- STEVENSON H.P., LESLIE H., SHERIDAN B., Serum free beta human chorionic gonadotrophin concentrations increase in unseparated blood specimens, *Ann. Clin. Biochem.*, 1993, 30, 99-140.
- 34- ZIMMERMAN R., KELLER P.J., HUGH A., Increased maternal serum free β human chorionic gonadotrophin concentrations in Down's pregnancies: an artefactual finding ? *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1994, 101, 257-258.
- 35- SPENCER K., MAORI J.N., CARPENTER P., ANDERSON R., KRANTZ D.A., Stability of intact chorionic gonadotropin in serum, liquid whole blood and dried whole blood filter paper spots: impact on screening for Down syndrome by measurement of free beta hCG subunit, *Clin. Chem.*, 1993, 39, 1064-1068.
- 36- ROUX F., DAVIOS P., ROUX N., PELLISSIER M.C., Evaluation du facteur de risque de trisomie 21 fœtal; comparaisons de deux combinaisons de marqueurs sériques maternels : hCG + AFP + uE₃ versus β libre + AFP, *Immunoanal. Biol. Spec.*, 1995, 10, 167-174.
- 37- KRISTENSEN T., OXVIG C., SAND O., MOLLER N.P.H., SOTTRUP JENSEN L., Aminoacid sequence of PAPP-A derived from c-DNA, *Biochemistry*, 1994, 33, 1592-8.
- 38- SINOSICH M.J., DAVEY M.W., GHOSH P., GRUDZINSKAS J.G., Specific inhibition of human granulocyte elastase by human PAPP-A, *Biochem. Int.*, 1982, 5, 777-786.
- 39- EL FARRA K., GRUDZINSKAS J.G., Will PAPP-A be a biochemical marker for screening of Down's syndrome in the first trimester ? *Early Pregnancy*, *Biol. Med.*, 1995, 1, 4-12.
- 40- BRAMBATI B., Mc INTOSH M.C., TEISNER B., MAGUINESS S., SHRIMANKER K., LANZANI A., BONACCHI I., TULEU L., CHARD T., GRUDZINSKAS J.G., Low maternal serum Levels of PAPP-A in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype, *Br. J. Obst. Gynaecol.*, 1993, 100, 324-326.
- 41- BRIZOT M.L., SNIJDERS R.A., 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.
- 42- CUCKLE H., Screening at 11-14 weeks gestation: the role of established markers and PAPP-A., in: *Screening for Down's syndrome*, Grudzinskas J.G., Chard T. and Chapman M.G. (Eds), Cambridge Univ. Press., Cambridge, 1994, 311-323.
- 43- SINOSICH M.J., Past, present and future of PAPP-A, in: *Placental and endometrial proteins*, Tomoda Y., Mizutani S., Marita O, and Klopffer A. (Eds), NSP, Amsterdam, 1988, 11-18.
- 44- SINOSICH M.J., Antenatal testing with pregnancy associated markers, *Clin. Biochem. Rev.*, 1994, 15, 3-8.

- 45- YING S.Y., Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of FSH. *Endocrin. Rev.*, 1988, 9, 267-293.
- 46- MASSAGNE J., The transforming growth factor beta family, *Ann.Rev. Cell. Biol.*, 1990, 6, 597-641.
- 47- HEALY D.L. et al., Inhibin and related peptides in pregnancy, *Baillere's. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1990, 4, 233-247.
- 48- ILLINGWORTH P.J. et al., Measurement of circulating inhibin forms during the establishment of pregnancy, *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996, 81, 1471-1475.
- 49- VAN LITH J.M. et al., Second trimester maternal serum immunoreactive inhibin as a marker for fetal Down's syndrome, *Prenat. Diagn.*, 1992, 12, 801-806.
- 50- SPENCER K. WOODS P.J., ANTHONY F.W., Elevated levels of maternal serum inhibin immunoreactivity in second trimester pregnancies affected by Down's syndrome, *Ann.Clin. Biochem.*, 1993, 30, 219-220.
- 51- GROOME N.P. and al., Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay, *Clin. Endocrinol.*, 1994, 40, 717-723.
- 52- CUCKLE H.S. and al., Maternal serum dimeric inhibin-A in second trimester Down's syndrome pregnancies, *Prenat. Diagn.*, 1995, 15, 385-386.
- 53- SPENCER K., WALLACE E.M., RITOE S., Second trimester dimeric inhibin-A in Down's syndrome screening, *Prenat. Diagn.*, 1996, 16, 1101-1110.
- 54- WALLACE E.M., and al, Second trimester screening for Down's syndrome using maternal serum dimeric inhibin-A, *Clin. Endocrinol.*, 1996,44, 17-21.
- 55- AITKEN D.A., WALLACE E.M., CROSSLY J.A., Dimeric inhibin-A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy, *N. Engl. J. Med.*, 1996, 334, 1231-1236.
- 56- HADDOW J.E. and al., Second trimester screening for Down's syndrome using maternal serum dimeric inhibin, *Am. J. Med. Screen.*, 1998, 5, 115-119.
- 57- BLITHE DL., WEHMANN RE., NISULA BC., β core chemical and clinical properties, *Trends. Endocrinol. Metab.*, 1990, 1, 394-398.
- 58- CUCKLE H. S. and al., Urinary multiple marker screening for Down's syndrome, *Prenat. Diagn.*, 1995, 15, 745-751.
- 59- ROZEMBERG P., GILLET A., Les marqueurs biologiques de la trisomie, *Spectra. Biol.*, 1997, 16, 84, 39-44.
- 60- CUCKLE H.S., WALD N.J., Screening for Down's syndrome, in: *Prenatal diagnosis and prognosis*, R. Lilford (Ed), London 1990, 67-92.
- 61- CALVAS P., Place du dosage de l'alphafœtoprotéine sérique maternelle dans le diagnostic prénatal des anomalies fœtales, *Immunoanal. Biol. Spec.*, 1992, 33, 33-38.
- 62- HOLLOWAY P.J., BULUSU S., Maternal serum screening for Down's syndrome: false positive rates in different ethnic groups, in: *Proceedings of the ACB national meeting*, Piggott Cambridge, Glasgow 1995, 81.
- 63- CROSSLEY J.A., BERRY E., AITKEN D.A., CONNOR J.M., Insulin dependent diabetes and prenatal screening results: current experience from a regional screening pro-

gramme, in: Proceedings of the ACB national meeting, Piggott Cambridge, Glasgow 1995, 83.

64- CUCKLE H.S., WALD N.J., DENSEM J.W., The effect of smoking in pregnancy on maternal serum alpha-foetoprotein and human chorionic gonadotropin levels, *Br. J. Gynaecol.*, 1990, 97, 272-276.

65- CHARD T., KITAU M.J., LEDWARD R., COLTART T., EMBURY S., SELLER M.J., Elevated levels of maternal plasma alpha-foetoprotein after amniocentesis, *Br. J. Obstet. Gynaec.*, 1975, 83, 33-34.

66- SIMPSON J.L., SHULMAN L., DUNGAN J., PHILLIPS O., ELIAS S., Mid trimester biochemistry in prediction of third trimester complications, in: *Screening for Down's syndrome*, Ed. Grudzinskas J.G., Chard T., Chapman M. and Cuckle H., Cambridge Univ. Press., 1994, 325-338.

67- CROSSLEY J.A., AITKEN D.A., BERRY E., CONNOR J.M., Screening for trisomy 18 : a practical addition to biochemical screening for Down's syndrome, in: *Proceedings of the ACB national meeting*, Glasgow 1995, Piggott Cambridge, 83-84.

68- CHARD T., ILES R., Measurement of human chorionic gonadotrophin as a screening test for Down's syndrome, in: *Screening for Down's syndrome*. Ed. Grudzinskas J.G., Chard T., Chapman M. and Cuckle H., Cambridge Univ. Press., Cambridge 1994, 73-84.

69- CHARD T., Mc INTOSH M.C.M., Biochemical screening for Down's syndrome, *J. Clin. Ligand Assay.*, 1995, 18, 126-134.

70- MACRI J.N., KASTURI R.V., KRANTZ D.A., Maternal serum Down's syndrome unconjugated oestriol is not useful, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1990, 162, 672-673.

71- REYNOLDS T.M., Screening by test combinaison: a statistical overview, in: *Screening for Down's syndrome*, Ed. Grudzinskas J.G., Chard T., Chapman M., and Cuckle H., Cambridge Univer. Press., Cambridge, 1994, 47-72.

72- NORGAARD-PEDERSEN B., ALFTHAN H., ARENDS J., HOGDALL C.K., LARSEN S.O., PETTERSSON K., STENMAN V.H., SALOMON R., A new simple and rapid dual assay for AFP and free β CG in screening for Down syndrome, *Clin. Genet.*, 1994, 45, 1-4.

73- KNIGHT G.J., PALOMAKI G.E., HADDOW J.E., MILLER W., BERSINGER N.A., SCHNEIDER H., PAPP-A as a marker for Down syndrome in the second trimester of pregnancy, *Prenat. Diagn.*, 1993, 13, 222-223.

74- BRAMBATI B., TULIN L., BONACCHI I., SUSUKI Y., SHRIMANKER K., GRUDZINSKAS J.G., Biochemical screening for Down's syndrome in the first trimester, in: *Screening for Down's syndrome*. Grudzinskas J.G., Chard T., Chapman M. and Cuckle H. (Eds), Cambridge Univ. Press., Cambridge, 1994, 285-294.

75- SPENCER K., MACRI J.N., AITKEN D.A., CONNOR J.M., Free β hCG as first trimester marker for fetal trisomy, *Lancet*, 1992, 13, 1480.

76- MACRI J.N., SPENCER K., AITKEN D.A., GARVER K., BUCHANAN P.D., MULLER F., BOUE A., First-trimester free β hCG screening for Down's syndrome, *Prenat. Diagn.*, 1993, 13, 557-562.

- 77- WALD N.J., KENNARD A., HACKSHAW A.K., First trimester serum screening for Down's syndrome, *Prenat. Diagn.*, 1995, 15, 1227-40.
- 78- HURLEY P.A., WARD R.H.T., TEISNER B., ILES R.K., LUCAS N., GRUDZINSKAS J.G., Serum PAPP-A measurements in first trimester screening for Down's syndrome, *Prenat. Diagn.*, 1993, 13, 903-908.
- 79- ROBERTS L.J., BEWLEY S., MACKINSON A.M., RODECK C.H., First trimester fetal nuchal translucency: Problems with screening the general population, 1, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1995, 102, 3 81-3 85 .
- 80- BEWLEY S., ROBERT L.J., MACKINSON A.M., RODECK C.H., First trimester fetal nuchal translucency: Problems with screening the general population, 2, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1995, 102, 386-388.
- 81- HAFNER E. et al., Results of routine fetal nuchal translucency measurement at weeks 10-13 in 4233 unselected pregnant women, *Prenat. Diagn.*, 1998, 18, 1, 29-34.
- 82- BRIZOT M.L., SNIJDERS R.J.M., BERSINGER N.A., KUHN P., NICOLAIDES K.H., 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, 918-922.
- 83- NOBLE P.L., ABRAMA N.D., SNIJDERS R.J.M., SHERWOOD R., NICOLAIDES K.H., Screening for fetal trisomy 21 in the first trimester of pregnancy: maternal serum free β hCG and fetal nuchal translucency thickness ultrasound, *Obstet. Gynecol.*, 1995, 6, 390-395.
- 84- GUIBAUD S . et al., Comportements particuliers des marqueurs sériques d'évaluation du risque de trisomie 21, *Ann. Biol. Clin.*, 1998, 56, 439-444.
- 85- NEVEUX L.M. et al., Multiple marker screening for Down's syndrome in twin pregnancies, *Prenat. Diagn.*, 1996, 16, 29-34.
- 86- WALD N.J. et al., Antenatal screening for Down's syndrome, *J. Med. Screen.*, 1997, 4, 181-246.
- 87- RIBBERT L.S.M. et al., Maternal serum screening for fetal Down's syndrome in IVF pregnancies, *Prenat. Diagn.*, 1996, 16, 35-38.
- 88- LATHAM S.E., et al., A monoclonal antibody to human placental lactogen hormone facilitates isolation of fetal cells from maternal blood in a model system, *Prenat. Diagn.*, 1996, 16, 813-821.
- 89- VALERIO D. et al., Culture of fetal erythroid progenitor cells from maternal blood for non invasive prenatal genetic diagnosis, *Prenat. Diagn.*, 1996, 16, 1073-1082.
- 90- HANSEN M.W. et al., The effect of chorionic villus sampling on the number of fetal cells isolated from maternal blood and maternal serum alphafetoprotein levels, *Prenat. Diagn.*, 1997, 17, 953-959.

ASPECTS PRATIQUES DU DÉPISTAGE PAR LES MARQUEURS SÉRIQUES MATERNELS

FANNY LEWIN

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Le dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels est très encadré sur le plan législatif.

Ce dépistage n'est pas obligatoire, mais doit être proposé, sans être banalisé, à toutes les femmes enceintes. Il ne s'agit pas d'un dépistage de masse, ce qui ne serait pas acceptable sur le plan éthique, mais d'un dépistage individuel : en effet, chaque patiente signe un « consentement éclairé » prouvant qu'elle a bien reçu l'information et qu'elle accepte le test en étant bien avertie des conséquences éventuelles.

Les paramètres pris en compte pour le calcul de risque sont le dosage des marqueurs sériques, l'âge maternel et le terme exact de la grossesse qui doit avoir été confirmé par une échographie.

I. L'INFORMATION

I. 1- Modalités

Elle est, avant la réalisation des dosages, l'étape essentielle.

Elle a lieu lors de la première consultation prénatale. Il est nécessaire de prendre le temps d'expliquer le principe de ce dépistage, le rendu de résultat en taux de risque, l'éventualité d'une amniocentèse (dans 5 % des cas en moyenne, en sachant que le taux d'amniocentèse augmente avec l'âge : après 35 ans le test de dépistage induit une amniocentèse 1 fois sur 4). Il est important d'insister sur deux points dès la première consultation :

- être dans une zone à risque « plus élevé » (supérieur à 1/250) signifie que l'amniocentèse est conseillée, mais que le caryotype est normal dans la grande majorité des cas.
- être dans une zone à faible risque ne signifie pas risque nul : il persiste un faible risque résiduel car il ne s'agit pas d'un diagnostic, mais d'un dépistage.

Ces notions doivent être bien intégrées avant les dosages car, sinon, le résultat sera susceptible d'engendrer une angoisse démesurée.

Un document écrit reprenant tous ces points est remis à la patiente qui pourra le relire, au domicile, avec son conjoint.

Ce document est le suivant :

INFORMATION SUR LE DÉPISTAGE DE LA TRISOMIE 21 PAR LES MARQUEURS SANGUINS MATERNELS

UNE MÉTHODE D'ÉVALUATION DU RISQUE DE TRISOMIE 21 DANS LE SANG MATERNEL EN COURS DE GROSSESSE

Cette méthode ne permet pas à elle seule de diagnostiquer la trisomie 21. Elle permet seulement de dépister les femmes ayant un risque élevé et conduit à identifier pendant la grossesse 60 % environ des cas de trisomie 21.

Qu'est-ce que la trisomie 21 ?

La trisomie 21 ou mongolisme est la cause la plus fréquente de retard mental chez l'enfant. Elle est due à la présence d'un chromosome supplémentaire. La moitié des enfants atteints de trisomie 21 sont également porteurs de malformations. Leur espérance de vie est maintenant de plus de 50 ans.

Le risque de trisomie 21, très faible chez la femme jeune, augmente avec l'âge, surtout après 38 ans. Cependant la majorité des enfants atteints naissent de femmes âgées de moins de 38 ans, car c'est dans cette tranche d'âge que les naissances sont les plus nombreuses.

Comment savoir si le fœtus a une trisomie 21 ?

Pour savoir si le fœtus est porteur d'une trisomie 21, il faut étudier ses chromosomes (caryotype). Avant la naissance, ceci nécessite un prélèvement de liquide amniotique (amniocentèse). Ce geste peut être suivi de fausse couche (environ 1 fois sur 100). C'est pourquoi on ne propose pas l'amniocentèse à toutes les femmes mais seulement à celles qui ont un risque élevé. Jusqu'à présent, elle était proposée essentiellement aux femmes à partir de 38 ans.

Pour dépister les patientes qui ont un risque élevé on dispose maintenant d'une méthode d'évaluation du risque de trisomie 21 à partir du dosage de marqueurs dans le sang maternel.

Ce dépistage n'est pas obligatoire mais proposé à toutes les femmes enceintes.

EN PRATIQUE

L'analyse de sang ne peut être réalisée que dans un laboratoire autorisé à pratiquer ces dosages.

Le dosage dans le sang maternel de marqueurs sériques (actuellement hCG, alpha-fœtoprotéine) doit être effectué entre la 15^e et la 18^e semaine après la date des dernières règles.

Quelques jours après le prélèvement sanguin, le résultat revient chez votre médecin exprimé en risque (par exemple, 1 sur 500, 1 sur 100, etc.).

- si le risque est considéré comme élevé c'est-à-dire supérieur à 1/250, une amniocentèse est proposée, ce qui permet de vérifier le caryotype du fœtus. Il est normal dans 98 % des cas.

- si le risque est faible (par exemple, 1/500, 1/800, etc.), l'amniocentèse n'est pas justifiée car il est très peu probable que le fœtus soit atteint, alors que le risque de fausse couche induite est proche de 1/100.

Si vous êtes dans une zone « à risque » (supérieure à 1/250), le résultat vous sera communiqué par téléphone, ou d'une autre façon si vous préférez (le signaler lors de la prise de sang).

Vous ne serez pas contactée si le risque est faible. Les résultats vous seront exposés lors de la consultation suivante.

Une période de réflexion est nécessaire avant de signer le « consentement éclairé » qui sera adressé, avec le prélèvement, au laboratoire autorisé. Le prescripteur signe de son côté un document prouvant qu'il a bien donné l'information et qui sera joint au prélèvement (cf. document n°1).

I.2- Difficultés

Proposer à toutes les femmes enceintes un test de dépistage de la trisomie 21 n'est pas anodin. Il est difficile pour un grand nombre de patientes, et même pour certains prescripteurs, de comprendre la notion de calcul de risque ; il est impensable pour certains de réaliser une amniocentèse avec le risque qu'elle comporte ; il n'est pas évident, pour d'autres enfin, d'envisager une interruption médicale de grossesse pour trisomie 21.

Ainsi, l'information donnée aux femmes enceintes doit s'adapter. S'adapter au niveau intellectuel, au degré de compréhension de la langue, à la culture, la religion, au sentiment vis-à-vis de l'interruption médicale de grossesse. Il faut savoir envisager avec elles toutes les éventualités et savoir accepter leur décision de faire ou de ne pas faire ce test, sans qu'aucune opinion personnelle n'interfère. Il est ridicule d'insister auprès d'une patiente qui, de toute façon, ne ferait pas d'amniocentèse ; il faut au contraire la rassurer en sachant trouver les bons mots. « Il est vrai que vous êtes jeune, et que l'échographie est parfaite. Votre risque est réellement très faible.

Il faut éviter, en proposant ce test, de générer une angoisse en insistant sur l'éventualité d'une anomalie chromosomique à laquelle elle n'avait même pas songé.

Enfin, la signature du consentement peut paraître surprenante, pour les patientes françaises qui ne sont pas habituées à ces démarches. Elle peut être à l'origine d'un climat de méfiance. Il faut donc savoir en expliquer la raison : ce dépistage n'est pas obligatoire et reste le fait d'une décision personnelle.

■ II. LE RÉSULTAT

Le résultat est exprimé en taux de risque (*cf.* document n°2).

Si le résultat montre un risque inférieur à 1/250, il est remis à la patiente lors de la consultation suivante, en expliquant une fois de plus la signification du calcul de risque.

Si le résultat montre un risque supérieur à 1/250, la patiente est prévenue par téléphone, après avoir été avertie, lors du prélèvement, de cette éventualité. Là aussi, il faut savoir redire que « zone à risque plus élevé » ne signifie pas anomalie chromosomique et être prêt à recevoir le couple en urgence pour réexpliquer la signification du test. Une consultation de conseil génétique précède l'amniocentèse.

Conclusion

Sur le plan pratique, le dépistage par les marqueurs sériques maternels pose essentiellement le problème de l'angoisse générée par les résultats. Il est donc indispensable de prendre le temps nécessaire pour les explications, mais on peut déjà imaginer qu'avec le temps ce dépistage deviendra mieux connu et donc mieux compris.

**Demande d'estimation du risque de trisomie 21 fœtale
à l'aide des marqueurs sériques maternels**

Identification du médecin prescripteur

NOM/Prénom
ADRESSE

Je certifie avoir informé la patiente de l'intérêt des marqueurs sériques dans l'évaluation du risque accru de trisomie 21 fœtale, des limites de ce test et de ses implications en cas de risque élevé.

Date
Signature

Date du prélèvement :

Identification de la patiente

NOM :
PRENOM
Date de naissance :

Date des dernières règles : / /
Date de début de grossesse : / /
(déterminée par échographie)
Poids (au jour du prélèvement) : kg

Autres renseignements
Grossesse multiple : non oui
Tabagisme : non oui
Diabète : non oui

CONSENTEMENT AU DEPISTAGE DU RISQUE DE TRISOMIE 21 PAR ANALYSE BIOCHIMIQUE DES MARQUEURS SERIQUES DANS LE SANG MATERNEL

Après la consultation médicale prévue à l'article R. 162-16-7 du code de La Santé Publique, je soussignée, déclare avoir reçu les informations suivantes :

Le prélèvement sanguin qui m'est proposé doit donner lieu au dosage d'au moins deux marqueurs. Ce dosage sera effectué dans un laboratoire autorisé à effectuer ce type d'analyses par le ministre chargé de la santé.

Cet examen a pour but d'évaluer le risque pour l'enfant à naître d'être atteint de la trisomie 21 (mongolisme). Il ne permet pas à lui seul d'établir le diagnostic de la trisomie 21.

Le résultat de l'examen, exprimé en taux de risque, me sera rendu et expliqué par le médecin qui me l'a prescrit, Si ce risque est considéré comme élevé (par exemple 1/100, 1/50 ...), il me sera proposé un prélèvement de liquide amniotique (amniocentèse) pour établir une analyse chromosomique du fœtus (caryotype). Si ce risque est considéré comme faible (par exemple 1/300, 1/500...), il n'exclut jamais la possibilité de trisomie 21 à la naissance.

En l'état actuel, la sensibilité du test ne permet pas de détecter plus de 60 % des trisomies 21.

Je consens au prélèvement de sang ainsi qu'au dosage de ces marqueurs.

Date : Signature de l'intéressée

Partie réservée au laboratoire
Âge gestationnel au moment du prélèvement : SA + jour(s)
Numéro de dosage

DOCUMENT N° 2 : Feuille de résultats

Laboratoire des hormones et marqueurs

Autorisation DPN notifiée le 6 Mai 1996 par la Direction des Hôpitaux

Biologistes agréés :

Pr J. INGRAND - Dr Y. FULLA

**Résultats de l'évaluation du risque de trisomie 21 fœtale
à l'aide des marqueurs sériques maternels**

Service demandeur : Maternité

Compte rendu d'analyses en date du :		
NOM :	Prénom :	N° Identification
Date de naissance		

Age gestationnel échographique à la date du prélèvement : (sem.j) <small>(Âge gestationnel calculé en semaines d'aménorrhée d'après les informations fournies)</small>
Date de prélèvement :

hCG (hCG Amerlex - M RIA *)	AFP (AFP Amerlex - M RIA *)
<input type="text" value="UI/ml"/>	<input type="text" value="UI/ML"/>
<input type="text" value="Mdm"/>	<input type="text" value="Mdm"/>

Evaluation du risque d'anomalie chromosomique

calcul réalisé sur le logiciel PRENATA *

Risque lié à l'âge maternel seul

Risque combiné
(âge maternel + marqueurs biochimiques)

Commentaires :

Dr Y. FULLA

Pr J. INGRAND

L'appartenance à un groupe à risque accru n'équivaut pas à un diagnostic de certitude. Un risque combiné inférieur au seuil de 1/250 (ex : 1/300 ...) n'exclut pas totalement la survenue d'une grossesse affectée. Il signifie simplement que la patiente appartient à un groupe à faible risque.

* Réactifs et Logiciel commercialisés par la Société Ortho Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson)

ÉCHOGRAPHIE ET DÉPISTAGE DE LA TRISOMIE 21

FANNY LEWIN

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

La reconnaissance des fœtus porteurs d'une trisomie 21 à l'échographie est souvent difficile ; elle repose sur l'étude minutieuse de chaque organe qui doit faire partie de tout examen échographique. Elle se heurte à plusieurs difficultés : les fœtus trisomiques ne sont pas tous malformés ; les malformations, lorsqu'elles existent, ne sont pas spécifiques et sont souvent de diagnostic tardif ; certaines conditions, comme l'épaisseur de la paroi abdominale maternelle ou la position fœtale, peuvent rendre l'examen moins performant ; enfin, le dépistage des anomalies échographiques est opérateur dépendant.

■ I. AUX DEUXIÈME ET TROISIÈME TRIMESTRES DE LA GROSSESSE

À partir du deuxième trimestre de la grossesse, on distingue deux groupes d'anomalies échographiques de la trisomie 21

I.1- Les malformations viscérales majeures

Elles sont observées chez 30 à 50 % des fœtus :

- malformations cardiaques, notamment canal atrio-ventriculaire, communications inter-auriculaire et interventriculaire, tétralogie de Fallot,
- malformations digestives, essentiellement la sténose duodénale (fig. 1), plus rarement l'atrésie de l'œsophage,



Figure 1 : Sténose duodénale : image en double bulle correspondant à l'estomac et au premier duodénum dilatés.

- l'hygroma colli,
- les autres anomalies sont plus rares : pyélectasies (fig. 2), dilatation ventriculaire cérébrale, ou encore intestin hyperéchogène, excès de liquide amniotique.



Figure 2 : Pyélectasie bilatérale.

Dans ce premier groupe, le caryotype fait partie du bilan de prise en charge des malformations.

I.2- Les signes mineurs de dysmorphologie fœtale

On recherche une diminution de la longueur des os longs (fig. 3), une protrusion de la langue, une dysmorphie craniofaciale (hypoplasie des os propres du nez), des anomalies mineures des extrémités comme la brièveté de la deuxième phalange du cinquième doigt (brachymésophalangie du V), le retard d'ossification calcanéen, ou un écart anormal entre les premier et deuxième orteils.



Figure 3 : Mesure de la longueur fémorale.

Dans ce contexte de séméiologie échographique fine, c'est plutôt l'association des signes qui sera évaluée avant de pratiquer un caryotype fœtal.

Aucune de ces anomalies échographiques du deuxième trimestre n'est suffisamment discriminante et toutes sont trop tardives pour être utilisées dans un contexte de dépistage.

■ II. PREMIER TRIMESTRE DE LA GROSSESSE

La situation est différente : les anomalies majeures sont rarement détectables en dehors de l'hygroma colli (fig. 4 et 5) ou de l'anasarque fœtale (fig. 6). En revanche, la présence fréquente chez les fœtus porteurs de trisomie 21 d'un œdème sous-cutané localisé à la face postérieure du cou est le signe échographique précoce le plus intéressant. Cet œdème transitoire se traduit par une augmentation de l'épaisseur de la clarté nucale (fig. 7). Cette zone hypoéchogène physiologique, mesurée sur une coupe sagittale, dépend du terme (fig. 8) et est inférieure à 3 mm entre 12 et 14 SA. La mesure est opérateur dépendante et sa précision ne dépasse pas 0,5 mm.



Figure 4 : Hygroma cervical : coupe transversale.

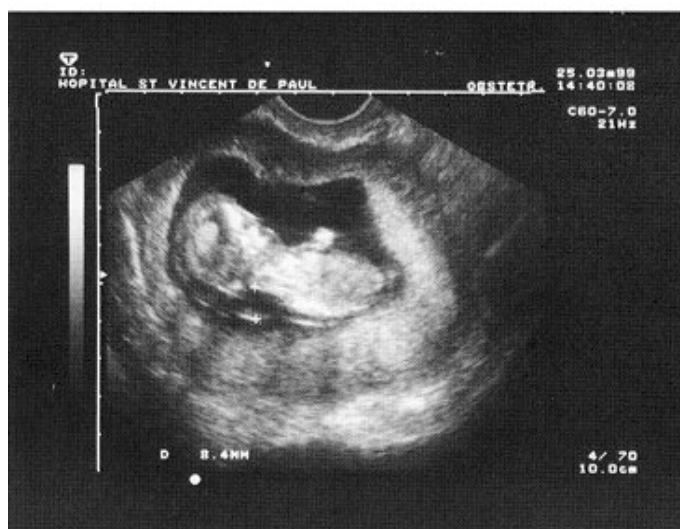


Figure 5 : Hygroma cervical : coupe sagittale.



Figure 6 : Œdeme généralisé (anasarque).

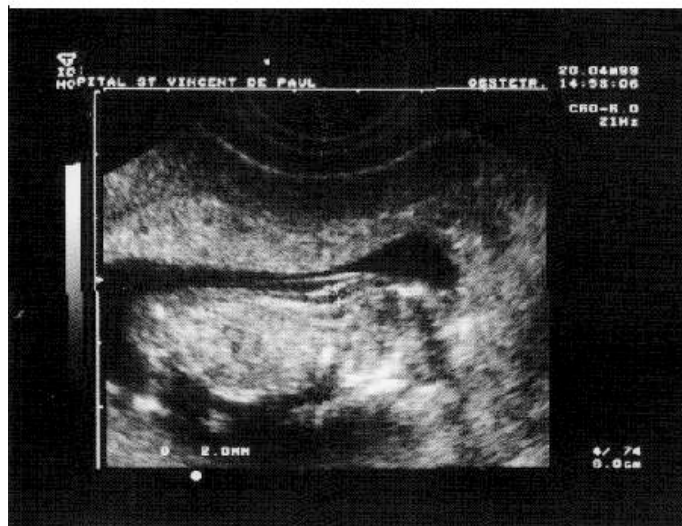


Figure 7a : Clarté nucale (coupe sagittale).

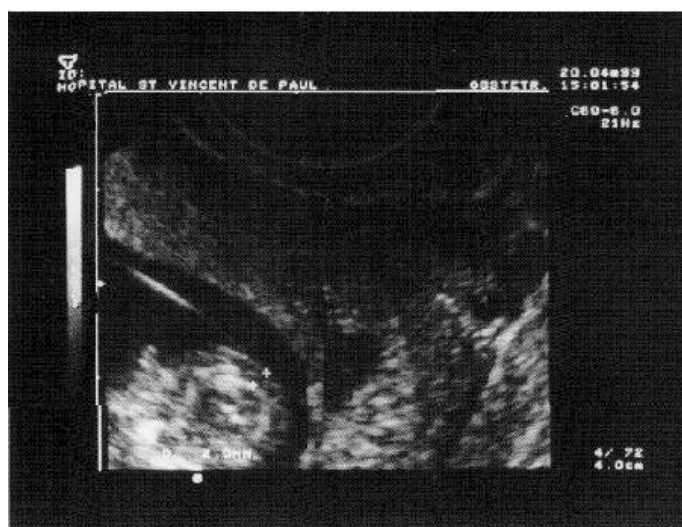


Figure 7b : Clarté nucale (coupe transversale).

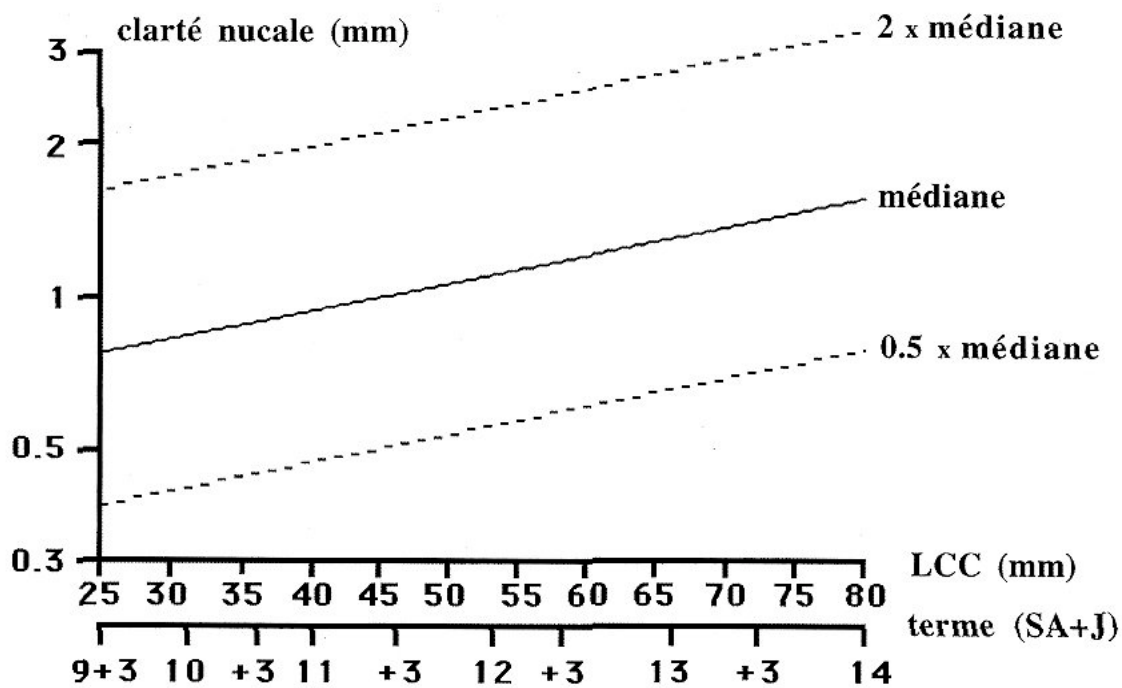


Figure 8 : Épaisseur de la clarté nucale en fonction du terme.
 Schuchter K., Wald N., Hackshaw A. K., Hafner E., Liebhart E., *The distribution of nuchal translucency at 10-13 weeks of pregnancy, Prenat. Diagn., 1998, 18, 281-286.*

Les premières séries prospectives, où la mesure de la clarté nucale rapportée à l'âge gestationnel est combinée à l'âge maternel, montrent un taux de détection de 84 % pour 6 % de faux positifs. Cette évaluation doit tenir compte du fait qu'une partie de ces trisomies aurait donné lieu à une fausse couche spontanée. D'autres séries montrent un taux de détection moindre et soulignent la variabilité inter-opérateur de la mesure.

L'augmentation de l'épaisseur de la clarté nucale semble être un facteur indépendant des marqueurs biologiques. Les stratégies futures de dépistage viseront à la combinaison des marqueurs échographiques et biologiques soit au premier trimestre, soit de façon séquentielle.

I. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE FŒTAL EN DEHORS DU DÉPISTAGE PAR LES MARQUEURS SÉRIQUES MATERNELS

I.1- Les mères âgées de plus de 38 ans

Il existe un consensus pour maintenir le remboursement du diagnostic prénatal chromosomique pour toutes les mères âgées de plus de 38 ans. L'attitude la plus cohérente « en population » est le dépistage par les marqueurs sériques quel que soit l'âge maternel. L'alternative du dépistage sérique, souvent choisie par les parents, doit être envisagée avec eux.

I.2- Antécédent pour le couple d'une anomalie chromosomique lors d'une précédente grossesse

Le caryotype fœtal est généralement une demande du couple qui doit, bien entendu, y avoir accès. Pour ces anomalies de novo, le risque de récurrence est faible (cf. épidémiologie) mais l'expérience douloureuse vécue par les parents justifie amplement ce diagnostic.

I.3- Parents porteurs d'une anomalie chromosomique, en général équilibrée

C'est le cas d'un couple sur 250. L'anomalie est détectée à l'occasion d'une stérilité, de fausses couches spontanées itératives, de la naissance d'un enfant atteint, d'une enquête familiale. Le risque d'anomalie déséquilibrée varie de 5 à 20 % selon le remaniement.

I.4- Diagnostic de sexe fœtal

La détermination du sexe fœtal dans les maladies récessives liées à l'X permet de ne pratiquer le diagnostic de l'affection que si l'enfant est de sexe masculin.

I.5- Les signes d'appel échographiques

Les anomalies morphologiques fœtales, le retard de croissance intra-utérin, les anomalies du liquide amniotique doivent faire pratiquer un caryotype fœtal, élément indispensable au diagnostic, à la prise en charge et au conseil génétique.

I.6- Les autres indications

Dans plusieurs situations, le risque d'anomalie chromosomique n'est pas accru. La demande de caryotype fœtal est justifiée par l'anxiété particulière des parents, spontanée ou induite par une expérience douloureuse et la crainte d'un accident d'une autre nature.

Dans la plupart des centres, le caryotype est pratiqué lorsque le prélèvement a lieu pour un autre diagnostic.

Dans ces deux cas, le caryotype est à la charge des parents.

■ II. MODES DE PRÉLÈVEMENTS FŒTAUX

L'établissement du caryotype fœtal peut se faire à partir de cellules fœtales du liquide amniotique (prélevé par amniocentèse), du sang fœtal (prélevé par ponction du cordon), ou de cellules trophoblastiques (prélevées par biopsie des villosités chorales).

Chacune de ces techniques présente des avantages et des risques qui sont à prendre en compte à chaque fois que l'indication d'un caryotype fœtal est posée.

II.1-Amniocentèse (figure 1)

Décrite pour la première fois en 1882, ce procédé a été utilisé de façon plus courante vers les années 50 pour le diagnostic et la surveillance de la maladie hémolytique.

Le développement des techniques de culture cellulaire et d'analyse chromosomique a permis le diagnostic de maladies génétiques sur des cellules fœtales obtenues par amniocentèse en 1966.

Cette technique a été introduite en France en 1972.

II.1.1- Technique

Il s'agit d'un geste simple. Elle consiste à prélever du liquide amniotique sous contrôle échographique permanent :

- l'échographie préalable permet de vérifier le terme de la grossesse, la vitalité fœtale, de localiser le placenta, de repérer les citernes amniotiques ;
- après désinfection cutanée, une aiguille de 20 gauge est introduite par voie transabdominale. L'échoguidage permet de diriger l'aiguille vers la plus grande citerne ;
- la quantité de liquide prélevé est fonction du terme, en moyenne 1 cc par semaine d'aménorrhée ;
- techniquement, elle peut être réalisée très tôt dans la grossesse, mais elle est déconseillée avant 12 SA.

Le terme optimal pour un caryotype programmé est 14-15 SA.

Après 33-34 SA, les cellules du liquide amniotique poussent mal, le sang fœtal sera préféré.

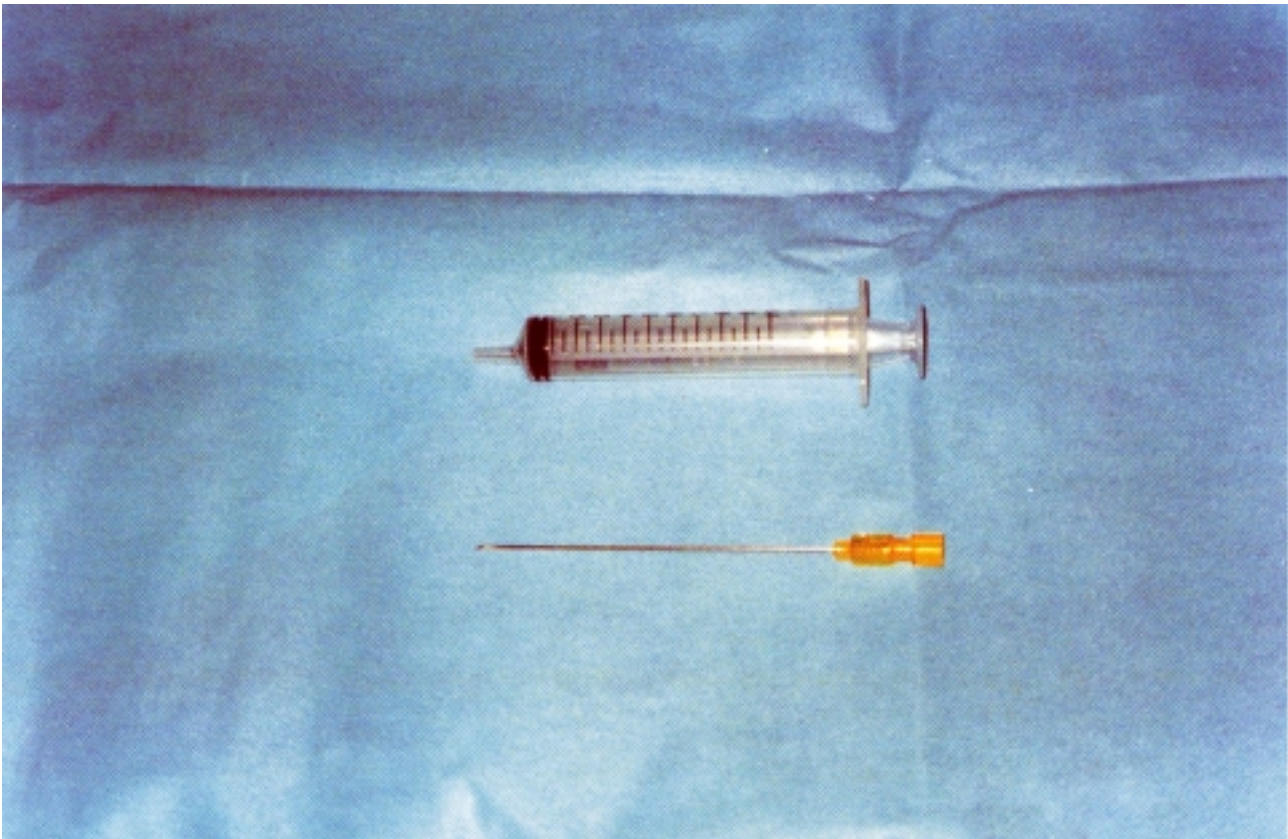


Figure 1a : Matériel pour amniocentèse.

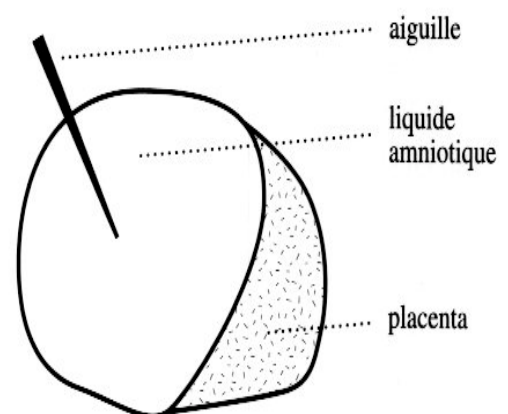


Figure 1b : Amniocentèse.

II.1.2- Inconvénients

Le délai d'obtention du caryotype est relativement long (10 à 20 jours). Cette attente peut être mal vécue, surtout si le caryotype a été effectué sur « signes d'appel ».

II.1.3- Incidents - accidents

- Le risque de blessure fœtale est devenu exceptionnel depuis l'échoguidage permanent.
- L'échec de ponction est rare. Les ponctions sanglantes peuvent se produire, entraînant une gêne à l'analyse du liquide.
- Les fausses couches sont l'accident le plus fréquent. Leur taux est estimé à 0,5 à 1 %. Elles surviennent le plus souvent dans la semaine suivant le prélèvement. La cause infectieuse est la plus fréquente.
- L'iso-immunisation rhésus est prévenue par l'injection systématique d'une ampoule de gammaglobulines anti-D chez les femmes rhésus négatif.
- Les complications maternelles sont rares, mais parfois très graves. Elles sont généralement infectieuses : endométrite entraînant une fausse couche fébrile, mais exceptionnellement septicémie parfois foudroyante.

II.2- Prélèvement de trophoblaste (figure 2)

Réalisé à partir de 10 semaines d'aménorrhée, ce type de prélèvement présente l'avantage d'un diagnostic précoce, permettant de simplifier l'éventuelle interruption médicale de grossesse.

II.2.1- Techniques

Elles consistent à prélever, sous échoguidage permanent, un fragment de trophoblaste ou villosités choriales, d'environ 5 mg.

L'échographie préalable permet de vérifier le terme, la vitalité, de dépister une grossesse multiple rendant le prélèvement beaucoup plus difficile et de repérer le trophoblaste.

a) Deux techniques sont possibles :

- biopsie à la pince par voie transcervicale : en position gynécologique, après désinfection cervicovaginale, introduction d'une pince à biopsie par le col sous échoguidage permanent. Le risque infectieux peut être réduit par le contrôle bactériologique vaginal préalable et un traitement antibiotique systématique.
- biopsie-aspiration à l'aiguille par voie transabdominale : la technique est la même que celle de l'amniocentèse ; l'aiguille se dirige jusqu'au trophoblaste et une dépression importante est réalisée à l'aide d'une seringue reliée à l'aiguille par un cathéter. Une pince à biopsie peut également être introduite, après anesthésie locale.

b) À part, la choriocentèse : prélèvement à l'aiguille ou à la pince, au niveau du placenta, surtout utilisée en fin de grossesse pour obtenir un caryotype rapide en cas d'absence de liquide amniotique (anamnios).

II.2.2- Incidents-accidents

- Le risque d'échec : le prélèvement de trophoblaste nécessite un apprentissage suffisant. Un échec après trois tentatives doit faire arrêter le prélèvement.

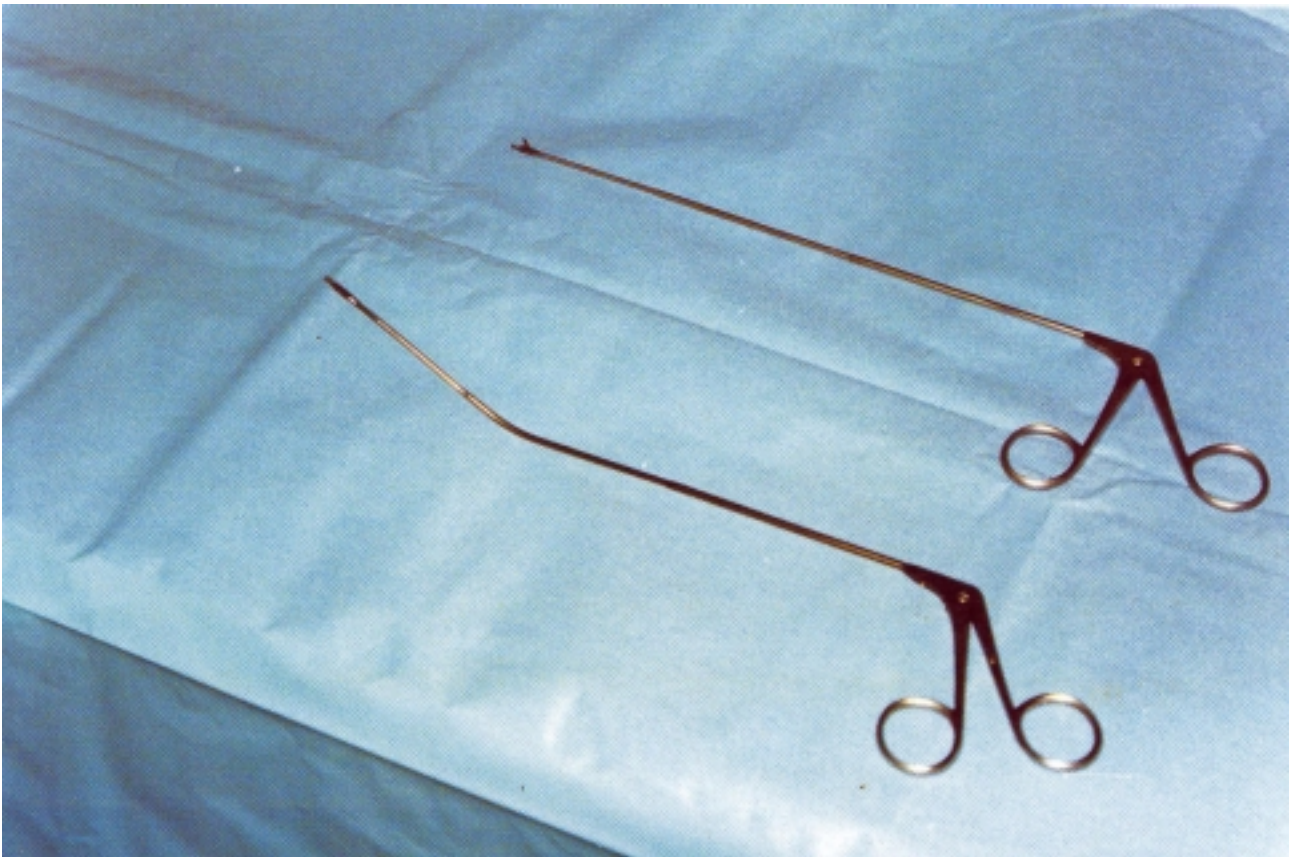


Figure 2a : Matériel pour prélèvement de trophoblaste (voie transcervicale).

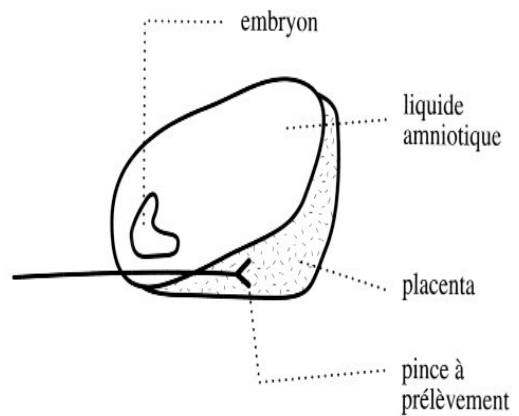
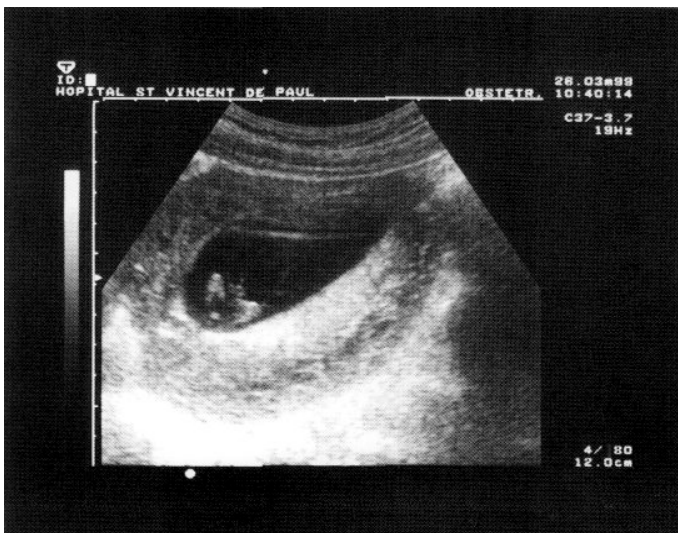


Figure 2b : Prélèvement de trophoblaste.

- Les complications maternelles sont essentiellement infectieuses, parfois graves. Il a été décrit des hémorragies ou perforations utérines, tout à fait exceptionnelles.

L'immunisation anti-D des femmes rhésus négatif doit être prévenue.

- Les complications fœtales :

- le taux de fausse couche, difficile à apprécier, est estimé aujourd'hui comparable à celui de l'amniocentèse soit 1 % . La voie transcervicale comporte un risque théorique infectieux supplémentaire, prévenu par une antibioprofylaxie.
- il a été décrit des malformations fœtales à type de réduction de membres en cas de prélèvements réalisés vers 8 semaines d'aménorrhée ; le terme de 9-10 semaines doit être considéré comme une limite inférieure absolue.

II.3- Prélèvement de sang fœtal (figure 3)

D'abord décrit sous fœtoscopie (1976), l'abord sanguin fœtal sous échoguidage (1982) a permis de simplifier considérablement l'accès au diagnostic et à la thérapeutique fœtale.

II.3.1- Technique

- L'échographie préalable permet de repérer l'insertion placentaire du cordon.
- L'aiguille (19 ou 20 gauge) est introduite après désinfection cutanée et anesthésie locale, sous échoguidage permanent, vers les vaisseaux du cordon près de l'insertion placentaire.
- Cette technique, plus délicate que l'amniocentèse, nécessite un opérateur entraîné.
- Ce prélèvement peut être effectué dès 18 semaines d'aménorrhée et jusqu'au terme.
- Le sang fœtal prélevé doit être « pur », c'est-à-dire ni contaminé par du sang maternel ni dilué par du liquide amniotique.
- La quantité de sang prélevé est limitée.
- Le caryotype est obtenu en 4 à 5 jours.

II.3.2- Incidents-accidents

- Les difficultés de prélèvement peuvent être dues à une obésité maternelle, une insertion du cordon mal visualisée, un oligoamnios. Le risque d'échec et d'accident est fonction de l'expérience de l'opérateur.
- Les accidents fœtaux à type de fausse couche, rupture des membranes, hémorragie au point de ponction sont décrits, mais rares. Une bradycardie fœtale est fréquente mais transitoire. Globalement, le taux d'accidents dans les meilleures équipes est de 0,5 % à 1 %.

Conclusion

Les méthodes de prélèvement afin d'établir un caryotype fœtal sont aujourd'hui, grâce à l'échoguidage, considérablement simplifiées.

Quelle que soit la méthode utilisée, les risques de perte fœtale, bien que faibles, sont à prendre en considération. Le choix de la méthode tiendra compte du terme de la grossesse et de l'indication du caryotype : ainsi, l'existence d'un hygroma cervical à l'échographie de 12 SA fera pratiquer un prélèvement de trophoblaste alors que l'âge maternel constitue une indication d'amniocentèse à 14 SA. Ceci est résumé dans le tableau I.

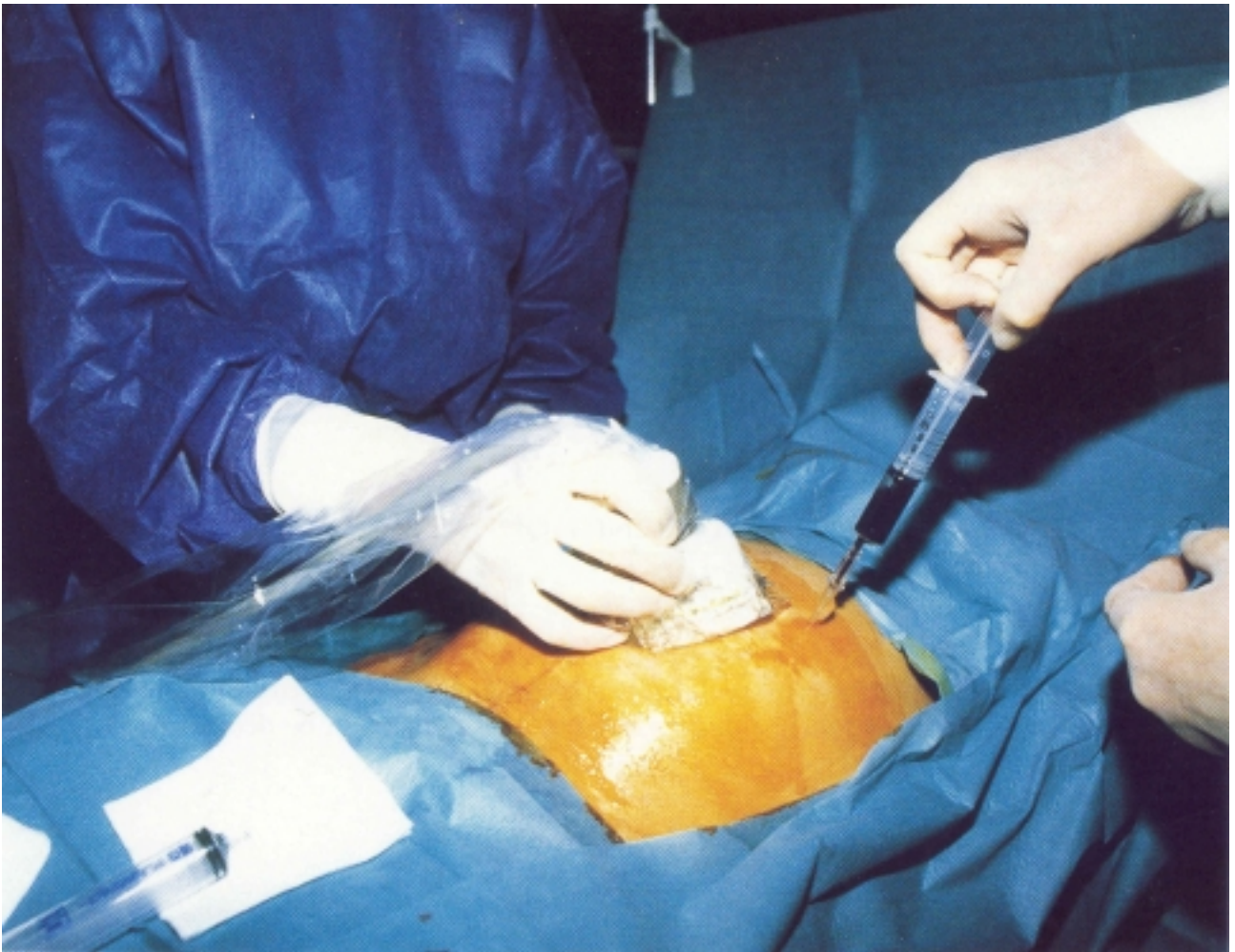


Figure 3a : Prélèvement de sang fœtal.

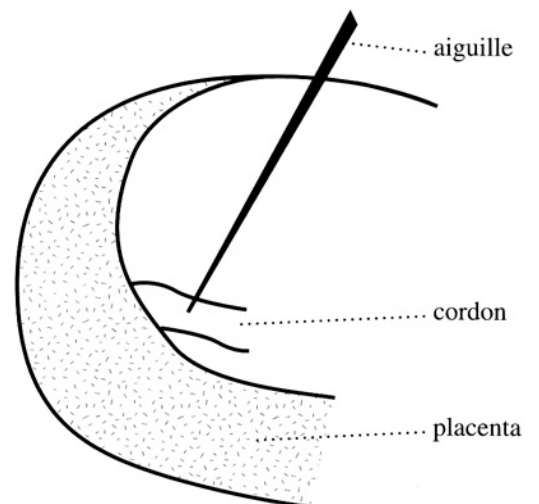
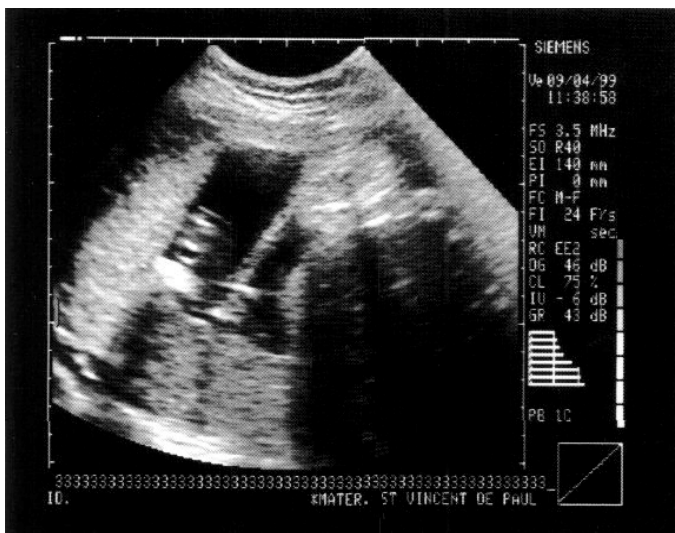


Figure 3b : Prélèvement de sang fœtal par ponction du cordon

Tableau I : Mode de prélèvement en fonction du terme et de l'indication

Indication du caryotype	Méthode utilisée
Caryotype programmé dès le début de la grossesse - âge maternel - parents porteurs d'une anomalie chromosomique - antécédents d'une grossesse avec anomalie chromosomique	Amniocentèse 14-15A
Anomalie échographique 1er trimestre 2e trimestre 3e trimestre	Trophoblaste 12 SA Amniocentèse Sang fœtal
Marqueurs sériques	Amniocentèse au résultat

■ III. LES TECHNIQUES CYTOGÉNÉTIQUES

III.1- Le caryotype

Le caryotype est la représentation et la classification des chromosomes pendant la métaphase de la mitose. Sa résolution est celle de la microscopie photonique et ne dépasse pas 5.10^6 paires de bases.

III.1.1.- Trois étapes sont nécessaires à sa réalisation

III.1.1.1- Obtenir des cellules en division

Une culture cellulaire est le plus souvent indispensable (cellules amniotiques, lymphocytes sanguins, fibroblastes) mais on peut aussi examiner les divisions spontanées lorsqu'elles sont suffisamment nombreuses in vivo comme dans le cytotrophoblaste des villosités chorales du placenta.

III.1.1.2- Obtenir des métaphases

Elles doivent être nombreuses et de bonne qualité : après accumulation des métaphases, on procède à la dispersion chromosomique dans le cytoplasme par l'action d'une solution hypotonique suivie d'une fixation.

III.1.1.3- Identifier les chromosomes

Une simple coloration permet de compter et de classer les chromosomes selon leur taille et la position de leur centromère et de savoir rapidement s'il existe une anomalie du nombre des chromosomes.

Les méthodes de marquage, par dénaturation enzymatique (figure 1) ou thermique (figure 2) des préparations, révèlent le long des chromosomes une alternance de bandes transversales faiblement ou fortement colorées. Elles permettent d'identifier un chromosome surnuméraire et de mettre en évidence les anomalies de la structure chromosomique.

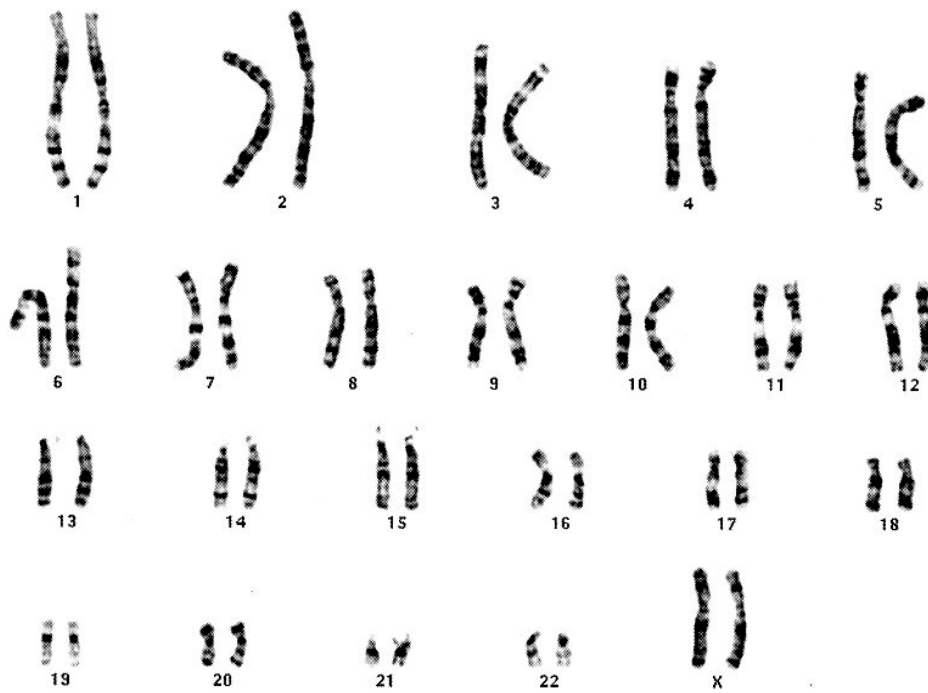


Figure 1 : Caryotype féminin normal : 46,XX. Lymphocytes sanguins. Marquage en bandes G (GTG) obtenu par dénaturation enzymatique.



Figure 2 : Caryotype masculin normal : 46,XY. Lymphocytes sanguins. Marquage en bandes R (RHG) obtenu par dénaturation thermique.

III.1.2- Les cellules amniotiques

Dans les conditions idéales, 10 à 15 ml de liquide amniotique sont nécessaires à la culture. La quantité de cellules « viables » dépend du terme du prélèvement et est suffisante après la 14^e semaine. Le rejet des premières gouttes de liquide prélevées minore le risque de contamination de la culture par les cellules maternelles.

Trois récipients de culture, au minimum, sontensemencés et placés dans deux incubateurs différents.

Les colonies de cellules se développent en 7 à 12 j ours ; les mitoses sont récoltées lorsque ces colonies sont nombreuses et riches en divisions cellulaires.

16 à 20 cellules issues de 10 à 16 colonies et de deux sources de culture différentes sont photographiées, les chromosomes comptés et classés grâce au marquage chromosomique pour au moins quatre d'entre elles.

Les cultures sont entretenues jusqu'au compte rendu écrit.

III.1.3- Les cellules des villosités choriales

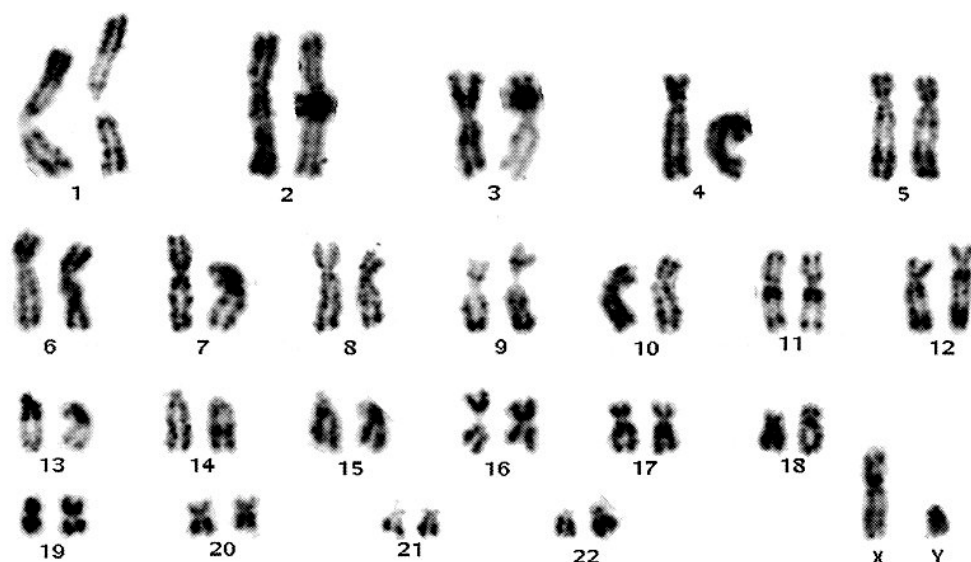
5 à 10 mg de villosités choriales sont nécessaires à la réalisation de l'examen dans de bonnes conditions.

Pour pallier les difficultés d'interprétation liées aux mosaïques confinées au placenta et aux discordances fœtoplacentaires (faux positifs et faux négatifs) la technique directe sera toujours doublée d'une culture à long terme.

III.1.3.1- La technique directe utilise les divisions spontanées du cytotrophoblaste surtout abondantes au cours du premier trimestre de la grossesse.

Après une incubation de quelques heures, les mitoses peuvent être récoltées et examinées le résultat demande 24 à 48 heures.

La majorité des anomalies chromosomiques, les anomalies de nombre et les anomalies de grande taille de la structure chromosomique, sont détectables par ce moyen mais l'étude fine des chromosomes n'est pas possible (figure 3).



46,XY

RHG

VILLOSITES CHORIALES : TECHNIQUE DIRECTE

Figure 3 : Caryotype masculin normal : 46,XY. Cellules trophoblastiques après technique directe. Marquage en bandes R de faible résolution.

III.1.3.2- La culture à long terme des villosités se fait à partir des fibroblastes de l'axe des villosités (mésenchyme extra-embryonnaire).

Le fragment biopsié est émincé et dissocié par une enzyme puis mis en culture.

Le résultat demande 10 à 20 jours ; le niveau de résolution cytogénétique est analogue à celui des cellules amniotiques.

Les contaminations maternelles ne sont pas exceptionnelles.

III.1.4- Les lymphocytes sanguins

Ils peuvent être cultivés à partir de 1 ml de sang fœtal.

Le sang total, recueilli stérilement sur héparine, est incubé 48 à 72 heures dans un milieu contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (phytohémagglutinine ou PHA).

Le résultat est obtenu en 4 à 5 jours.

III.2- L'hybridation in situ

L'hybridation in situ permet de visualiser sur les métaphases ou les noyaux interphasiques une région ou un site chromosomiques donnés si l'on dispose d'une sonde d'ADN, séquence nucléotidique spécifique du locus ou du chromosome à étudier.

L'ADN de la sonde et l'ADN du patient (noyaux ou métaphases sur lame) sont dénaturés puis incubés ensemble. Si les deux brins sont complètement ou partiellement complémentaires, il y a formation d'hybrides ADN/ADN. Leur révélation in situ est possible en incorporant aux sondes des nucléotides liés à la biotine ou la digoxigénine qui seront détectés en fluorescence par un système d'anticorps couplés à un fluorochrome.

III.2.1 - Hybridation in situ métaphasique

Les sondes sont hybridées sur des étalements chromosomiques et les signaux fluorescents visualisés sur les chromosomes.

Complément efficace de la cytogénétique conventionnelle, elle aide à identifier un remaniement structural ou un chromosome surnuméraire et peut permettre la détection de microremaniements non décelables par les techniques habituelles comme la microdélétion 22q11 du syndrome de Di George et du syndrome vélo-cardio-facial (figure 4).

III.2.2- Hybridation in situ interphasique

Les signaux fluorescents sont révélés sur les noyaux en interphase, sans culture cellulaire (figure 5). L'utilisation simultanée de plusieurs sondes spécifiques (13, 18, 21, X et Y) permet la détection des principales aneuploïdies en 24 à 48 heures. L'examen est restreint à quelques trisomies sans permettre le diagnostic des autres anomalies chromosomiques qui sont tout aussi invalidantes. Un petit nombre de cas n'est pas informatif et la contamination par des cellules maternelles est source de faux négatifs. L'hybridation in situ interphasique ne doit pas exclure le caryotype afin d'offrir un résultat le plus complet possible dès lors qu'un geste invasif, entraînant un risque de perte fœtale, a été nécessaire.

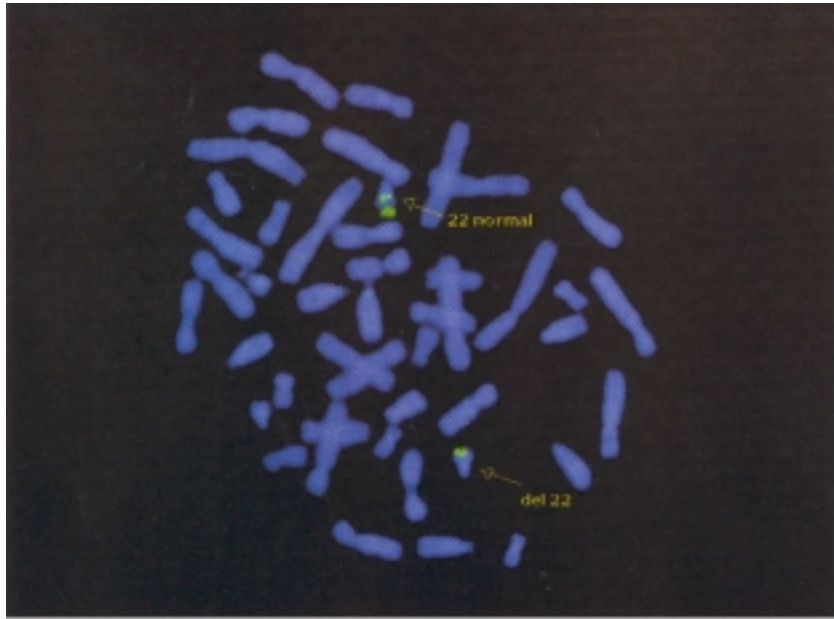


Figure 4 : Hybridation in situ métaphasique : délétion de la bande 22 q11.2 d'un syndrome de Di George, 46,XX. ish del(22)(q11.2q11.2)(D22S75-). Sonde spécifique localisée en 22q11.2

(D22S75 ONCOR) couplée à une sonde d'identification en 22q13.
Le chromosome délété n'est marqué que par cette sonde d'identification

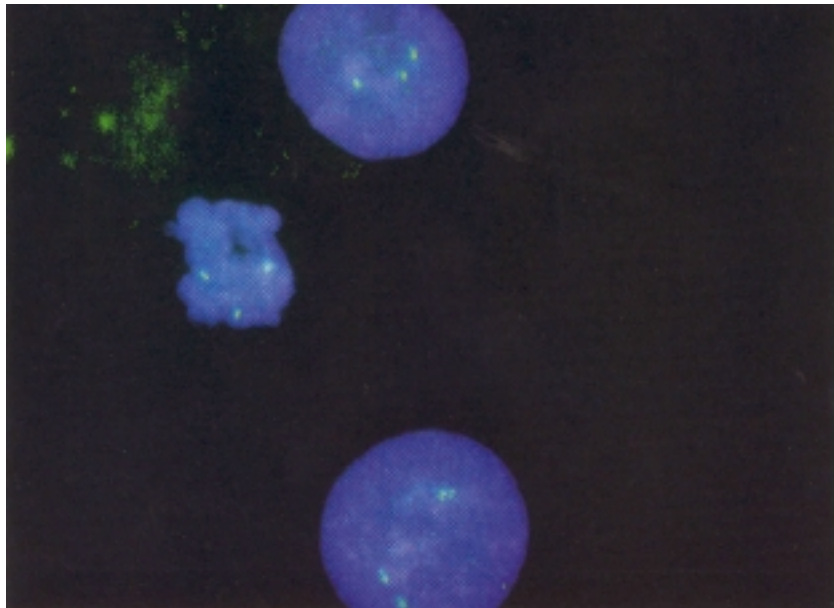


Figure 5 : Hybridation in situ interphasique. Sonde spécifique du chromosome 21 localisée en 21q22.2 (D21S55 ONCOR). Trisomie 21.

III.3- La PCR quantitative

La technique de PCR quantitative, à l'aide d'amorces spécifiques très polymorphes, permet de déterminer le nombre d'allèles pour chaque chromosome étudié. La détection des aneuploïdies est obtenue en 48 heures à partir d'un très petit nombre de cellules. Le caryotype complet est, là aussi, indispensable.

III.4- La détection des cellules fœtales dans le sang maternel

L'hybridation in situ interphasique et la PCR quantitative sont surtout prometteuses pour le dépistage des cellules du fœtus dans le sang maternel, méthode qui se heurte, à l'heure actuelle, à la détection spécifique d'un nombre suffisant de cellules fœtales parmi les cellules maternelles.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- DUTRILLAUX B ., COUTURIER J., La pratique de l'analyse chromosomique, Masson, Paris, 1981.
- 2- ROONEY D.E., CZEPULKOWSKI B.H., Human Cytogenetics. A Practical Approach, Volume I: Constitutional Analysis. Second Edition: The Practical Approach Series, Oxford University Press, New York, 1992.
- 3- GOSDEN J.R., Chromosome Analysis Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 29, Humna Press, Toyota, New Jersey, 1994.
- 4- VERMA R.S., BABU A., Human Chromosomes. Principles and Techniques, Second Edition, Mc Gray Hill, New York, 1995.
- 5- MITELMAN F., ISCN, 1995, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Karger, Basel, 1995 .
- 6- MULERIS M., RICHARD F., APIOU F., DUTRILLAUX B., Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire. Principes et techniques, Technique & Documentation, Paris, 1996.
- 7- POPESCU P., HAYES H., DUTRILLAUX B., Techniques de cytogénétique animale, INRA, Paris, 1998.
- 8- Laboratory Practice Committee, Standards and Guidelines: Clinical Genetics Laboratories, The American College of Medical Genetics, Bethesda, Maryland, 1996.
- 9- EUCHROMIC quality assessment group, Quality Guidelines and Standards for Genetic Laboratories/Clinics in Prenatal Diagnosis on Fetal Samples Obtained by Invasive Procedures. An attempt to establish a common European framework for quality assessment, EUCHROMIC, 1997.

La loi française autorise l'interruption médicale de grossesse à tout terme si deux médecins dont un expert auprès des tribunaux, l'autre exerçant dans un centre agréé de diagnostic prénatal, estiment qu'« il existe une forte probabilité pour que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité, reconnue comme incurable au moment du diagnostic ».

La trisomie 21, par le handicap mental qu'elle entraîne, est reconnue comme une affection grave et incurable et l'interruption de la grossesse, lorsqu'elle est demandée, est habituellement acceptée.

Cependant, les équipes médicales et notamment tous ceux qui participent au diagnostic prénatal de la trisomie 21 doivent garder à l'esprit :

- que les couples qui souhaitent un diagnostic prénatal de trisomie 21 ne souhaitent pas obligatoirement une interruption médicale de grossesse ;
- que l'opinion vis-à-vis d'une interruption de grossesse peut se modifier avec le temps, dans un sens ou dans l'autre ;
- qu'il n'est pas question de ne réserver le diagnostic prénatal qu'à ceux qui souhaitent une interruption de grossesse ;
- mais que notre devoir est d'informer sur cette éventualité avant tout acte de diagnostic prénatal ;
- et, qu'enfin, l'information donnée doit être claire et objective, sans parti pris.

Le diagnostic de la trisomie 21 se fait :

- soit au 1^{er} trimestre, après dépistage par les marqueurs sériques ou l'échographie ou après amniocentèse précoce pour âge maternel ;
- soit aux 2^e et 3^e trimestres, après découverte d'une anomalie échographique.

Les modalités d'interruption de grossesse varient en fonction du terme.

Dans tous les cas, l'annonce du diagnostic est un temps capital, quelle que soit la décision prise ultérieurement.

Elle ne se fait ni par téléphone, ni par courrier, mais lors d'un rendez-vous organisé à l'avance.

Elle se fait si possible en présence d'un psychologue.

Un long temps est consacré à l'écoute des parents et aux explications concernant la trisomie 21.

Lorsqu'une interruption de grossesse est demandée, les parents souhaitent que cela se fasse « au plus vite ».

L'expérience a montré qu'accéder à cette demande risque d'entraîner un deuil pathologique avec des conséquences à très long terme parfois :

- un délai de quelques jours est nécessaire pendant lequel un soutien psychologique est indispensable ;
- dès le premier entretien ou plus tard, selon le souhait des parents, sont abordées les questions concernant les modalités de l'interruption ;
- au 1^{er} trimestre et au début du 2^e, l'interruption se déroule de la même façon qu'une I.V.G. au bloc opératoire sous anesthésie générale :
 - préparation du col utérin (MIFEGYNE* 48 heures avant, ovule ou dilapans la veille)
 - anesthésie générale
 - aspiration
- aux 2^e et 3^e trimestres, l'interruption se déroule comme un accouchement, en salle de travail :
 - préparation du col utérin (identique)
 - analgésie péridurale
 - déclenchement du travail par analogues de prostaglandines

Afin de faciliter le travail de deuil, il est conseillé d'éviter l'anesthésie générale au moment de l'expulsion et d'inciter à voir l'enfant. L'accompagnement psychologique est ici particulièrement important.

Si le terme de la grossesse est supérieur à 28 SA ou si l'enfant est né viable puis décédé, une déclaration à l'état civil est enregistrée. Les parents peuvent alors, s'ils le souhaitent, organiser des obsèques.

Conclusion

Grâce aux nouvelles méthodes de déclenchement du travail par les prostaglandines, et grâce à l'analgésie péridurale, l'interruption médicale de grossesse s'est considérablement simplifiée sur le plan technique.

Cependant, elle constitue dans tous les cas un événement dramatique ; le rôle de l'équipe médicale est essentiel pour :

- guider les décisions qui, en fin de compte, sont prises par le couple ;
- proposer la méthode la plus efficace en fonction du terme ;
- accompagner et déculpabiliser.

ANNEXE I

■ EXTRAITS DES TEXTES LÉGISLATIFS ET RÉGLEMENTAIRES

- Loi n° 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal.
- Décret n° 95-558 du 6 mai 1995 relatif à la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal.
- Décret n° 95-559 du 6 mai 1995 relatif aux analyses de cytogénétique et de biologie pratiquées en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero*.

modifié par

- Décret n° 97-579 du 28 mai 1997 relatif aux analyses de cytogénétique et de biologie pratiquées en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero*.
- Arrêté du 30 septembre 1997 relatif au consentement de la femme enceinte à la réalisation des analyses mentionnées à l'article R 162-16-1 du code de la santé publique modifié par l'arrêté du 12 novembre 1997.
- Arrêté du 23 janvier 1997 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la Nomenclature des actes de biologie médicale.
- Arrêté du 11 février 1999 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la Nomenclature des actes de biologie médicale.

Loi n° 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal

... « *Art. L. 184-3.* - La Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal est chargée de donner un avis sur les demandes d'autorisation d'exercice des activités d'assistance médicale à la procréation et de diagnostic prénatal, sur les demandes d'agrément des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal ainsi que sur les décisions de retrait d'autorisation. Elle participe au suivi et à l'évaluation du fonctionnement des établissements et laboratoires autorisés.

« Elle remet chaque année au ministre chargé de la santé un rapport portant sur l'évolution de la médecine et de la biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal.

« La Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal comprend des praticiens désignés sur proposition de leurs organisations représentatives, des personnalités choisies en raison de leur compétence dans les domaines de la procréation, de l'obstétrique, du diagnostic prénatal, du conseil génétique et du droit de la filiation et des représentants des administrations intéressées et des ordres professionnels ainsi qu'un représentant des associations familiales.

« La commission est présidée par un membre de la Cour de cassation, du Conseil d'État ou de la Cour des comptes désigné par décret.

« Un décret en Conseil d'État fixe la composition de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal et détermine les modalités de son organisation et de son fonctionnement.

« *Art. L. 184-4.* - Le ministre chargé de la santé communique à la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal le rapport mentionné à l'article L. 184-2 et tous documents utiles pour les besoins de sa mission.

« *Art. L. 184-5.* - Les membres de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal et les personnes appelées à collaborer à ses travaux sont tenus, dans les conditions et sous les peines prévues à l'article 226-13 du code pénal, de garder secrètes les informations dont ils peuvent avoir connaissance en raison de leurs fonctions. »

Art. 12. - Il est inséré, au début du chapitre IV du titre I^{er} du livre II du code de la santé publique, un article L. 162-16 ainsi rédigé

« *Art. L. 162-16.* - Le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales ayant pour but de détecter in utero chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité. Il doit être précédé d'une consultation médicale de conseil génétique.

« Les analyses de cytogénétique et de biologie en vue d'établir un diagnostic prénatal ne peuvent être pratiquées, dans des conditions prévues par décret en Conseil d'Etat, que dans des établissements publics de santé et des laboratoires d'analyses de biologie médicale autorisés selon les modalités prévues par les dispositions des sections 1 et 2 du chapitre II du titre I^{er} du livre VII.

« Les autorisations prévues par le présent article sont délivrées pour une durée de cinq ans et sont accordées après avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la

reproduction et du diagnostic prénatal instituée par l'article L. 184-3 et du Comité national de l'organisation sanitaire et sociale. Pour les laboratoires d'analyses de biologie médicale, cette autorisation vaut inscription sur la liste prévue à l'article L. 759.

« Des centres de diagnostic prénatal pluridisciplinaires sont créés dans des organismes et établissements de santé publics et privés à but non lucratif. Leurs missions, leur rôle auprès des autres intervenants en matière de diagnostic prénatal et les conditions de leur création et de leur agrément sont définis par décret en Conseil d'État. »

Art. 13. - Le deuxième alinéa de l'article L. 162-12 du code de la santé publique est complété par une phrase ainsi rédigée

« En outre, si l'interruption de grossesse est envisagée au motif qu'il existe une forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic, l'un de ces deux médecins doit exercer son activité dans un centre de diagnostic prénatal pluridisciplinaire. »...

... « Art. L. 184-6. - Toute violation constatée dans un établissement ou un laboratoire, et du fait de celui-ci, des prescriptions législatives et réglementaires applicables à l'assistance médicale à la procréation ou au diagnostic prénatal entraîne le retrait temporaire ou définitif des autorisations prévues aux articles L. 184-1 et L. 162-16.

« Le retrait de l'autorisation est également encouru en cas de violation des prescriptions fixées par l'autorisation.

« Le retrait ne peut intervenir qu'après un délai d'un mois suivant une mise en demeure adressée par l'autorité administrative à l'établissement ou au laboratoire concerné et précisant les griefs. En cas de violation grave des dispositions de la loi n° 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal, l'autorisation peut être suspendue sans délai à titre conservatoire.

« La décision de retrait est prise après avis motivé de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal. Elle est publiée au Journal officiel de la République française...

... « Art. L. 162-18. - Le fait de procéder au diagnostic prénatal sans avoir reçu l'autorisation mentionnée à l'article L. 162-16 est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende.

« Art. L. 162-19. - Le fait de procéder à une interruption de grossesse après diagnostic prénatal sans avoir respecté les modalités prévues par la loi est puni de deux ans d'emprisonnement et de 200 000 F d'amende. »...

Décret n° 95-558 du 6 mai 1995 relatif à la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal et modifiant le code de la santé publique (deuxième partie : Décrets en Conseil d'État)

« Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal

« Paragraphe 1^{er}

« Composition et organisation de la commission

« *Art. R. 184-3-1.* - La Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal instituée à l'article L. 184-3 comprend, outre son président, des membres de droit et des membres nommés par arrêté du ministre chargé de la santé.

« *Art. R. 184-3-2.* - Le mandat des membres nommés est de trois ans. Il est renouvelable.

« *Art. R. 184-3-3.* - La commission comprend deux sections : la section de l'assistance médicale à la procréation et la section du diagnostic prénatal.

« La formation plénière est composée de l'ensemble des membres de la commission.

« *Art. R. 184-3-4.* - Sont membres de droit de chacune des deux sections :

« 1° Le directeur général de la santé ou son représentant ;

« 2° Le directeur des hôpitaux ou son représentant ;

« 3° Le directeur de la sécurité sociale ou son représentant ;

« 4° Le directeur général de la recherche et de la technologie au ministère chargé de la recherche ou son représentant ;

« 5° Le directeur des affaires civiles et du sceau au ministère de la justice ou son représentant ;

« 6° Le président du Conseil national de l'ordre des médecins ou son représentant ;

« 7° Le président du conseil central de la section G de l'ordre des pharmaciens ou son représentant ;

« 8° Le directeur de la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés ou son représentant ;

« 9° Le directeur de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale ou son représentant.

« *Art. R. 184-3-5.* - Sont nommés par arrêté du ministre chargé de la santé :

« 1. Membres de chacune des deux sections :

« *a)* Un représentant du Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé, proposé par le président du comité ;

« *b)* Un représentant des associations familiales, choisi sur une liste de trois personnes établie par le président de l'Union nationale des associations familiales ;

« *c)* Un médecin inspecteur d'une direction régionale ou départementale des affaires sanitaires et sociales ;

« *d)* Un pharmacien inspecteur d'une direction régionale des affaires sanitaires et sociales ;

- « e) Une haute personnalité scientifique ;
- « f) Un spécialiste du droit de la filiation ;
- « g) Un praticien ayant une formation ou une expérience particulière en génétique humaine, choisi sur une liste de trois personnes établie par la Société française de génétique humaine.

« 2. Membres de la section de l'assistance médicale à la procréation :

« A. - Praticiens désignés sur proposition des organisations représentatives :

« a) Un gynécologue-obstétricien et un biologiste, choisis sur une liste de trois gynécologues-obstétriciens et de trois biologistes établie par le Groupe d'étude de la fécondation *in vitro* en France ;

« b) Un biologiste de la reproduction, choisi sur une liste de trois biologistes établie par la Fédération des biologistes des laboratoires d'études de la fécondation et de la conservation de l'œuf ;

« c) Deux praticiens, l'un clinicien et l'autre biologiste, choisis sur une liste de six personnes établie par la Fédération des centres d'étude et de conservation des œufs et du sperme humains ;

« B . - Personnalités compétentes

« d) Un médecin choisi en raison de sa compétence dans le domaine de l'assistance médicale à la procréation avec tiers donneur ;

« e) Un épidémiologiste ayant une expérience en médecine de la reproduction ;

« f) Un gynécologue-obstétricien et un biologiste d'un établissement public de santé ayant une expérience dans le domaine de l'assistance médicale à la procréation ;

« g) Un gynécologue-obstétricien d'un établissement de santé privé ayant une expérience dans le domaine de l'assistance médicale à la procréation ;

« h) Un directeur de laboratoire d'analyses de biologie médicale ayant une expérience dans le domaine de l'assistance médicale à la procréation ;

« i) Un médecin choisi en raison de son expérience en andrologie ;

« j) Une personnalité scientifique choisie en raison de sa compétence dans la recherche en matière d'assistance médicale à la procréation.

« 3. Membres de la section du diagnostic prénatal :

« A. - Praticiens désignés sur proposition des organisations représentatives :

« a) Deux praticiens ayant une expérience de diagnostic prénatal, choisis sur une liste de six personnes établie par l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant ;

« b) Un médecin choisi sur une liste de trois personnes établie par l'Association des cytogénéticiens de langue française ;

« c) Un gynécologue-obstétricien expérimenté en matière de prélèvements sur le fœtus, choisi sur une liste de trois personnes établie par le collège national des gynécologues et obstétriciens français ;

« d) Un médecin choisi sur une liste de trois personnes établie par la Société francophone de médecine fœtale ;

« B. - Personnalités désignées en raison de leur compétence :

« e) Un pédiatre exerçant son activité en maternité ;

« f) Deux médecins expérimentés en échographie fœtale ;

« g) Deux biologistes ayant une expérience particulière dans la réalisation d'examens de biologie fœtale, dont l'un en biologie moléculaire ;

h) Deux praticiens ayant une expérience particulière dans la réalisation d'examens de cytogénétique, dont l'un exerce dans le secteur public et l'autre dans le secteur privé ;

« i) Une personnalité scientifique choisie en raison de sa compétence dans la recherche en matière de diagnostic prénatal.

« Art. R. 184-3-6. - En cas de cessation des fonctions d'un membre de la commission en cours de mandat pour quelque cause que ce soit, son remplacement s'effectue dans les mêmes conditions que sa nomination et pour la durée du mandat restant à accomplir.

« Art. R. 184-3-7. - Tout membre de la commission nommé par le ministre chargé de la santé qui est absent, sans motif légitime, à plus de trois séances consécutives de la formation plénière ou des sections peut être remplacé dans les conditions prévues à l'article R. 184-3-6.

« Paragraphe 2

« Attributions de la commission

... « Art. R. 184-3-9. - La section du diagnostic prénatal donne au ministre chargé de la santé des avis motivés sur :

« 1. Les demandes d'autorisation d'exercice des activités de diagnostic prénatal ; ces avis tiennent compte, notamment, de la formation, de la compétence et de l'expérience des praticiens responsables, des locaux et de l'équipement des centres, de l'organisation des activités et, le cas échéant, du volume d'activités et de la qualité des résultats obtenus ;

« 2. Les demandes d'agrément des centres de diagnostic prénatal pluridisciplinaires mentionnés à l'article L. 162-16 ; cet avis tient compte notamment de la formation, de la compétence et de l'expérience des praticiens et des modalités de fonctionnement des centres ;

« 3. Les demandes de renouvellement des autorisations et agréments, en tenant compte des résultats de l'évaluation des activités des centres ;

« 4. Les retraits d'autorisation et d'agrément.

« Art. R. 184-3-10. - La commission réunie en formation plénière exerce les attributions suivantes :

« 1 ° En application de l'article L. 152-8, elle examine les projets d'études sur embryons, qui ne peuvent être mis en œuvre, dans des conditions définies par décret en Conseil d'État, que sur son avis conforme. L'avis de la commission est émis au vu du rapport écrit présenté par un groupe technique désigné par le président et composé d'au moins six membres appartenant pour moitié à chacune des deux sections ;

« 2° En application de l'article L. 162-17, elle donne un avis motivé sur les demandes d'autorisation de pratiquer les activités de diagnostic biologique à partir de cellules prélevées sur l'embryon *in vitro* ;

« 3 ° Elle donne les avis mentionnés aux articles R. 184-3-8 et R. 184-3-9 lorsque l'affaire est renvoyée devant la formation plénière par le président de la commission, d'office ou à la demande de la majorité des membres d'une des deux sections ;

« 4° Elle adopte le rapport annuel prévu au deuxième alinéa de l'article L. 184-3.

« *Art. R. 184-3-11.* - Le rapport annuel mentionné à l'article précédent comporte un bilan des travaux de la commission et notamment de ses avis sur les demandes d'autorisation et d'agrément. Il présente l'évolution, pendant l'année écoulée, de la médecine et de la biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal, et fait apparaître les avancées scientifiques et techniques ainsi que leurs enjeux.

« Il comporte des recommandations tendant à promouvoir la qualité des activités exercées et à améliorer leur évaluation, ainsi que des propositions en matière d'enseignement, d'information du public et de recherche, en particulier dans le domaine de l'épidémiologie.

« Pour l'élaboration de ce rapport, la commission a connaissance de la synthèse nationale des rapports annuels d'activité mentionnés aux articles L. 184-2 et L. 673-5.

« *Art. R. 184-3-12.* - Chacune des sections ou la commission siégeant en formation plénière donne son avis sur les questions relatives à la médecine et à la biologie de la reproduction et au diagnostic prénatal dont elle est saisie par le ministre chargé de la santé.

« *Art. R. 184-3-13.* - Le ministre chargé de la santé prend les mesures appropriées en vue de faire participer la commission au suivi et à l'évaluation du fonctionnement des établissements et laboratoires autorisés à exercer des activités d'assistance médicale à la procréation ou de diagnostic prénatal.

« La commission a communication des rapports annuels d'activité prévus aux articles L. 184-2 et L. 673-5 et participe à leur analyse. Elle peut formuler des recommandations et, si nécessaire, proposer des contrôles.

« Chaque section apporte un conseil scientifique et technique aux autorités administratives chargées du contrôle et de l'évaluation des établissements et laboratoires susmentionnés.

« *Art. R. 184-3-14.* - Chacune des sections ou la commission siégeant en formation plénière peut appeler l'attention du ministre chargé de la santé sur toute question relative à ses domaines de compétence.

« *Paragraphe 3*

« **Fonctionnement**

« *Art. R. 184-3-15.* - La commission en formation plénière ou chacune des sections se réunit sur convocation du président. Cette convocation est de droit si elle est demandée par le ministre chargé de la santé. La commission peut également être convoquée à la demande de la majorité de ses membres.

« *Art. R. 184-3-16.* - Le président préside les séances de la commission en formation plénière et les séances de chacune des deux sections.

« Le décret qui désigne le président prévoit celui qui, parmi les membres de droit, est rappelé en son absence à le suppléer dans ses fonctions.

« *Art. R. 184-3-17.* - La commission réunie en formation plénière ou chacune des sections ne peut se prononcer que si la moitié au moins de ses membres sont présents ; toutefois, quand la majorité requise n'est pas atteinte à une réunion, le même ordre du jour est reporté à une réunion ultérieure tenue dans un délai de quinze jours ; les délibérations prises lors de cette deuxième réunion sont valables quel que soit le nombre des membres présents.

« La commission réunie en formation plénière ou chacune des sections se prononce à la majorité des voix des membres présents ; en cas de partage égal des voix, celle du président est prépondérante.

« *Art. R. 184-3-18.* - Le président peut constituer des groupes de travail chargés de toute question soumise à la commission.

« Les rapports présentés à la commission peuvent être confiés par le président à des membres de la commission, à des membres de l'inspection générale des affaires sociales, à des fonctionnaires de l'administration centrale ou des services déconcentrés du ministre chargé de la santé.

« *Art. R. 184-3-19.* - Le président peut appeler à participer aux travaux de la commission ou des groupes de travail, à titre consultatif et pour une ou plusieurs séances, toute personne dont le concours lui paraît utile pour l'étude d'une question déterminée.

« *Art. R. 184-3-20.* - Le secrétariat de la commission est assuré par la direction générale de la santé. »

Art. 2. - Le décret n° 88-328 du 8 avril 1988 portant création de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction est abrogé. Toutefois, cette commission reste en fonctions jusqu'à l'installation de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal instituée à l'article L. 184-3 du code de la santé publique.

Décret n° 95-559 du 6 mai 1995 relatif aux analyses de cytogénétique et de biologie pratiquées en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero* et modifiant le code de la santé publique (deuxième partie : Décrets en Conseil d'État)

Art. 1^{er}. - Au livre II, titre I^{er}, du code de la santé publique (deuxième partie : Décrets en Conseil d'État), il est inséré un chapitre IV ainsi rédigé :

« Actions de prévention concernant l'enfant

« *Art. R. 162-16-1.* - Les analyses de cytogénétique et de biologie mentionnées au deuxième alinéa de l'article L. 162-16 comprennent, lorsqu'elles sont pratiquées en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero* chez l'embryon ou le fœtus

« 1. Les analyses de cytogénétique, incluant la cytogénétique moléculaire sur cellules embryonnaires ou fœtales, y compris celles circulant dans le sang maternel ;

« 2. Les analyses de génétique moléculaire en vue du diagnostic de maladies génétiques ;

- « 3. Les analyses de biologie embryonnaire et fœtale, y compris celles de biologie moléculaire, en vue du diagnostic de maladies infectieuses ;
- « 4. Les analyses de biochimie sur l'embryon et le fœtus ;
- « 5. Les analyses d'hématologie sur l'embryon et le fœtus ;
- « 6. Les analyses d'immunologie sur l'embryon et le fœtus ;
- « 7. Les analyses de biochimie portant sur les marqueurs sériques d'origine embryonnaire ou fœtale dans le sang maternel.
- « Les analyses effectuées sur l'embryon ou le fœtus incluent celles qui sont pratiquées sur leurs annexes.
- « *Art. R. 162-16-2.* - Sans préjudice des conditions définies aux 1° et 2° de l'article L. 712-9, l'octroi ou le renouvellement de l'autorisation, mentionnée à l'article L. 162-16, de pratiquer une ou plusieurs des activités figurant à l'article R. 162-16-1 est subordonné au respect des règles fixées dans le présent chapitre. Ces règles constituent les conditions techniques de fonctionnement prévues au 3° de l'article L. 712-9.
- « Cette autorisation est délivrée à l'établissement public de santé ou au laboratoire d'analyses de biologie médicale par arrêté du ministre chargé de la santé pris dans les conditions fixées par l'article L. 162-16.
- « Lorsqu'un établissement public de santé ou un laboratoire d'analyses de biologie médicale comporte plusieurs sites, l'autorisation précise le ou les sites d'exercice des activités.
- « *Art. R. 162-16-3.* - Les activités mentionnées à l'article R. 162-16-1 sont exercées sous la responsabilité d'un ou de plusieurs praticiens dont le ou les noms figurent dans l'autorisation et qui sont seuls habilités à signer les comptes rendus d'analyses.
- « *Art. R. 162-16-4.* - Le praticien responsable mentionné à l'article R. 162-16-3 doit être médecin qualifié en biologie médicale ou pharmacien biologiste ou, à défaut, une personnalité scientifique justifiant de titres ou travaux spécifiques dans les domaines des activités définies à l'article R. 162-16-1.
- « Ce praticien doit, en outre, être soit spécialiste en génétique médicale, soit titulaire, selon les activités sur lesquelles porte la demande d'autorisation, d'un diplôme d'études spécialisées complémentaires de cytogénétique humaine, ou d'un diplôme d'études approfondies de génétique humaine, ou d'un diplôme d'études spécialisées complémentaires de biologie moléculaire, ou, à défaut, de titres, certificats, diplômes ou travaux d'un niveau jugé suffisant.
- « Dans tous les cas, le praticien responsable doit justifier d'une expérience en diagnostic prénatal.
- « L'avis rendu par la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal préalablement à l'autorisation mentionnée à l'article R. 162-16-2 comporte une appréciation sur la formation et l'expérience en diagnostic prénatal du ou des praticiens responsables.
- « *Art. R. 162-16-5.* - Lorsque les analyses définies à l'article R. 162-16-1 sont pratiquées dans un laboratoire d'analyses de biologie médicale, le praticien mentionné à l'article R. 162-16-3 doit avoir la qualité de directeur ou de directeur adjoint de laboratoire.

« *Art. R. 162-16-6.* - Pour obtenir l'autorisation mentionnée à l'article R. 162-16-2 l'établissement public de santé ou le laboratoire d'analyses de biologie médicale doit disposer de l'équipement nécessaire à la mise en œuvre des activités. Il doit en outre disposer :

« 1 ° D'une pièce destinée aux entretiens avec les familles concernées par le diagnostic prénatal ;

« 2 ° Pour l'activité définie au 1° de l'article R. 162-16-1 d'une pièce exclusivement réservée aux cultures cellulaires, équipée d'une hotte à flux laminaire ou d'un matériel équivalent et d'une pièce spécialement affectée aux techniques de cytogénétique proprement dite ;

« 3 ° Pour chacune des activités définies aux 2° et 3° de l'article R. 162-16-1, d'une pièce exclusivement réservée aux techniques d'amplification génique, aménagée de façon à garantir l'absence de toute contamination, comprenant au minimum une hotte à flux laminaire ou un matériel équivalent.

« *Art. R. 162-16-7.* - Les analyses de cytogénétique ou de biologie destinées à établir un diagnostic prénatal doivent avoir été précédées d'une consultation médicale de conseil génétique antérieure aux prélèvements, permettant

« 1 ° D'évaluer le risque pour l'enfant à naître d'être atteint d'une maladie d'une particulière gravité, compte tenu des antécédents familiaux ou des constatations médicales effectuées au cours de la grossesse ;

« 2° D'informer la femme enceinte sur les caractéristiques de cette maladie, les moyens de la détecter, les possibilités thérapeutiques et sur les résultats susceptibles d'être obtenus au cours de l'analyse ;

« 3 ° D'informer la patiente sur les risques inhérents aux prélèvements, sur leurs contraintes et leurs éventuelles conséquences.

« Le médecin consulté délivre une attestation signée certifiant qu'il a apporté à la femme enceinte les informations définies ci-dessus. Cette attestation est remise au praticien effectuant les analyses. Elle doit être conservée par l'établissement public de santé ou le laboratoire d'analyses de biologie médicale dans les mêmes conditions que le compte rendu d'analyses.

« *Art. R. 162-16-8.* - Les dispositions prévues aux articles R. 712-38 à R. 712-51 pour les autorisations d'activités de soins délivrées par le ministre chargé de la santé sont applicables aux demandes d'autorisation et de renouvellement d'autorisation prévues par le présent chapitre.

« Toutefois, les pièces du dossier justificatif prévu à l'article R. 712-40 sont complétées ou remplacées par les pièces d'un dossier spécifique dont la composition est fixée par arrêté du ministre chargé de la santé.

« *Art. R. 162-16-9.* - La forme, la périodicité et le contenu de l'évaluation périodique des activités régies par le présent chapitre, mentionnée à l'article L. 712-12-1, sont définis par un arrêté du ministre chargé de la santé. »

Art. 2. - Les établissements publics de santé et les laboratoires d'analyses de biologie médicale déjà autorisés à pratiquer des actes de diagnostic prénatal à la date de publication du présent décret doivent, dans un délai de six mois à compter de cette même date, deman-

der l'autorisation prévue par le présent décret, en fournissant aux autorités compétentes le dossier prévu par l'article R. 162-16-8 du code de la santé publique, faute de quoi la première autorisation cesse d'être valide.

Par dérogation à l'article R. 712-39 du même code, les autres établissements publics de santé et laboratoires d'analyses de biologie médicale peuvent également déposer un dossier de demande d'autorisation dans la période de six mois courant à compter de la publication du présent décret.

L'expiration de la période mentionnée aux alinéas précédents fait courir le délai de six mois prévu au troisième alinéa de l'article L. 712-16 du même code.

Décret n° 97-579 du 28 mai 1997 relatif aux analyses de cytogénétique et de biologie pratiquées en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero* et modifiant le code de la santé publique (deuxième partie : Décrets en Conseil d'État)

Art. 1^{er}. - L'article R. 162-16-7 du code de s santé publique est modifié comme suit :

a) Au premier alinéa, il est ajouté un 4^o ainsi rédigé :

« 4^o De recueillir, après lui avoir donné les informations susmentionnées, le consentement écrit de la femme enceinte à la réalisation des analyses ; le consentement est recueilli sur un formulaire conforme à un modèle fixé par arrêté du ministre chargé de la santé. » ;

b) Le deuxième alinéa est remplacé par les dispositions suivantes :

« Le médecin consulté délivre une attestation signée certifiant qu'il a apporté à la femme enceinte les informations définies ci-dessus, et conserve l'original de la déclaration de consentement de la patiente. L'attestation et une copie de la déclaration de consentement sont remises au praticien qui effectue les analyses ; elles doivent être conservées par l'établissement public de santé ou le laboratoire d'analyses de biologie médicale dans les mêmes conditions que le compte rendu d'analyses. » ;

c) Il est ajouté un troisième alinéa ainsi rédigé :

« Les comptes rendus des analyses mentionnées au premier alinéa ne peuvent être remis à la femme enceinte que par l'intermédiaire du médecin prescripteur. »

Arrêté du 30 septembre 1997 relatif au consentement de la femme enceinte à la réalisation des analyses mentionnées à l'article R 162-16-1 du code de la santé publique

Art. 1^{er}. - Lors de la consultation médicale de conseil génétique prévue à l'article R. 162-16-7 du code de la santé publique, pour toute prescription en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero* des analyses énumérées à l'article R. 162-16-1 du code de la santé publique, du 1^o au 6^o, le consentement écrit signé de la femme enceinte prévu à l'article R. 162-16-7 (4^o) est recueilli sur le formulaire type figurant en annexe I du présent arrêté.

Art. 2. - Lors de la consultation médicale de conseil génétique prévue à l'article R. 162-16-7 du code de la santé publique, pour toute prescription en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero* de l'analyse mentionnée à l'article R. 162-16-1 (7^o) du code de la santé

publique, le consentement écrit signé de la femme enceinte prévu à l'article R. 162-16-7 (4°) est recueilli sur le formulaire type figurant en annexe II du présent arrêté.

Arrêté du 12 novembre 1997 portant modification de l'arrêté du 30 septembre 1997 relatif au consentement de la femme enceinte à la réalisation des analyses mentionnées à l'article R. 162-16-1 du code de la santé publique

Art. 1^{er}. - Le formulaire type figurant en annexe I de l'arrêté du 30 septembre 1997 relatif au consentement de la femme enceinte à la réalisation des analyses mentionnées à l'article R. 162-16-1 du code de la santé publique est remplacé par le formulaire type figurant en annexe I du présent arrêté.

ANNEXE I

CONSENTEMENT DE LA FEMME ENCEINTE À LA RÉALISATION EN VUE DE DIAGNOSTIC PRÉNATAL *IN UTERO* D'UNE DES ANALYSES ÉNUMÉRÉES À L'ARTICLE R. 162-16-1, DU 1° AU 6°, DU CODE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Après la consultation médicale prévue à l'article R. 162-16-7 du code de la santé publique, je soussignée,, déclare avoir reçu les informations suivantes :

L'analyse qui m'est proposée en vue d'établir un diagnostic prénatal rend nécessaire un prélèvement de liquide amniotique, de sang fœtal ou de villosités choriales dont m'a été expliqué le risque ;

Cette analyse sera effectuée dans un laboratoire autorisé à la pratiquer par le ministre chargé de la santé ;

Si la technique demande une mise en culture de cellules fœtales, un échec de celle-ci est possible, pouvant rendre nécessaire un deuxième prélèvement ;

L'analyse peut révéler d'autres affections que celle recherchée dans mon cas ;

Le résultat de l'examen me sera rendu et expliqué par le médecin qui me l'a prescrit.

Je consens au prélèvement ainsi qu'à l'analyse de (1) pour laquelle il est effectué.

Date :

Signature de l'intéressée

(1) Préciser le type d'analyses :

- cytogénétique ;
- génétique moléculaire ;
- biologie fœtale en vue du diagnostic de maladies infectieuses ;
- biochimie (hors marqueurs sériques) ;
- hématologie ;
- immunologie.

ANNEXE II

CONSENTEMENT DE LA FEMME ENCEINTE À LA RÉALISATION EN VUE DE DIAGNOSTIC PRÉNATAL *IN UTERO* DE L'ANALYSE MENTIONNÉE À L'ARTICLE R. 162-16-1 (7°) DU CODE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Consentement au dépistage du risque de trisomie 21 par analyse biochimique des marqueurs sériques dans le sang maternel

Après la consultation médicale prévue à l'article R. 162-16-7 du code de la santé publique, je soussignée,, déclare avoir reçu les informations suivantes :

Le prélèvement sanguin qui m'est proposé doit donner lieu au dosage d'au moins deux marqueurs. Ce dosage sera effectué dans un laboratoire autorisé à effectuer ce type d'analyses par le ministre chargé de la santé ;

Cet examen a pour but d'évaluer le risque pour l'enfant à naître d'être atteint de trisomie 21 (mongolisme). Il ne permet pas à lui seul d'établir le diagnostic de la trisomie 21 ;

Le résultat de l'examen, exprimé en taux de risque, me sera rendu et expliqué par le médecin qui me l'a prescrit.

Si ce risque est considéré comme élevé (par exemple 1/100, 1/50...), il me sera proposé un prélèvement de liquide amniotique (amniocentèse) pour établir une analyse chromosomique du fœtus (caryotype).

Si ce risque est considéré comme faible (par exemple 1/300, 1/500...), il n'exclut jamais la possibilité d'une trisomie 21 à la naissance.

En l'état actuel, la sensibilité du test ne permet pas de déceler plus de 60 % des trisomies 21.

Je consens au prélèvement de sang ainsi qu'au dosage de ces marqueurs.

Date :

Signature de l'intéressée

Arrêté du 23 janvier 1997 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la Nomenclature des actes de biologie médicale

Art. 1^{er} - À la deuxième partie de la nomenclature des actes de la biologie médicale, le chapitre 2 (Actes de cytogénétique) est modifié comme suit :

« Caryotype fœtal

0040	Techniques avec incubation sans changement de milieu (villosités choriales, placenta, sang fœtal)	B 850
0041	Techniques avec culture (liquide amniotique, culture de villosités choriales)	B 1300

Les cotations des examens 0040 et 0041 ne sont pas cumulables.

Les dispositions de l'article 5 de la première partie ci-dessus sont applicables aux actes 0040 et 0041.

Ces actes sont pris en charge en présence de l'une des indications suivantes :

1° Âge de la femme supérieur ou égal à trente-huit ans à la date du prélèvement.

2° Anomalies chromosomiques parentales.

3° Antécédent, pour le couple, de grossesse(s) avec caryotype anormal.

4° Diagnostic de sexe pour les maladies liées au sexe.

5° Signes d'appel échographiques suivants : anomalies morphologiques du fœtus démontrées, internes ou externes, retard de croissance intra-utérin avéré, anomalies de quantité de liquide amniotique.

6° Grossesse à risque de trisomie 21 fœtale égal ou supérieur à 1/250, le risque ayant été estimé après dosage d'au moins deux marqueurs sériques maternels, dont l'hCG.

Pour les indications prévues au 5° ci-dessus, le compte rendu de l'examen échographique est joint à la demande d'entente préalable.

Pour les indications prévues au 6° ci-dessus, le compte rendu d'analyses du laboratoire défini au sous-chapitre 17-06 doit être joint à la demande d'entente préalable.

Art. 2. - Au chapitre 17 (Diagnostic prénatal) est ajouté

« Sous-chapitre 17-06

Analyses de biochimie portant sur les marqueurs sériques d'origine embryonnaire ou fœtale, dans le sang maternel, de risque accru de trisomie 21 fœtale.

Les sérums ayant fait l'objet d'un examen en vue d'une détermination des marqueurs sériques maternels doivent être conservés congelés un an à - 18°C.

4000	Dosage des marqueurs sériques de la trisomie 21 fœtale dans le sang maternel	B 180
------	--	-------

Les marqueurs recherchés

Détermination des valeurs d'au moins deux marqueurs, dont l'hormone chorionique gonadotrophine (hCG) permettant de calculer le risque pour une femme de porter un enfant atteint d'une anomalie chromosomique, et cela quel que soit son âge.

L'examen ne peut être pratiqué qu'à la 15^e, 16^e et 17^e semaine d'aménorrhée.

La prescription doit être accompagnée :

- de l'attestation signée du médecin prescripteur qu'il a apporté à la femme enceinte les informations définies à l'article R. 162-16-7 du code de la santé publique ;
- des renseignements suivants :
 - date de naissance de la patiente ;
 - meilleure estimation possible de l'âge gestationnel calculé d'après la date des dernières règles et par un examen échographique ;
 - éventuellement d'autres données pouvant influencer sur les valeurs des marqueurs, notamment la notion de grossesse multiple.

Le compte rendu d'analyses doit préciser

1. Les techniques, la marque des réactifs et le type de logiciel utilisés pour les dosages des marqueurs.
2. Les résultats des dosages des marqueurs sériques effectués.
3. Le risque calculé pour la patiente. »

Art. 3. - Les dispositions de l'article 1^{er}, en tant qu'elles ajoutent un 6^o au chapitre 2 de la deuxième partie de la nomenclature des actes de biologie médicale (actes de cytogénétique - caryotype fœtal) ainsi qu'un alinéa se rapportant à ce 6^o, et les dispositions de l'article 2 ci-dessus sont applicables pour une période de deux ans à compter de la date de publication du présent arrêté.

Arrêté du 11 février 1999 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la Nomenclature des actes de biologie médicale

Art. 1^{er} - A la deuxième partie de la Nomenclature des actes de biologie médicale, au chapitre 2 (Actes du cytogénétique), sous la rubrique Caryotype fœtal sont ajoutées les phrases suivantes

« Le laboratoire qui effectue le caryotype doit être en possession de l'attestation de consultation médicale et du consentement écrit de la patiente en application de l'article R. 162-16-7 du code de la santé publique.

Le compte rendu ne peut être remis à la femme que par l'intermédiaire du médecin prescripteur. »

Art. 2. - L'article 3 de l'arrêté du 23 janvier 1997, qui limitait l'application des dispositions du 6° du chapitre 2 de la deuxième partie de la Nomenclature des actes de biologie médicale, ainsi que l'alinéa se rapportant à ce 6° et des dispositions du sous-chapitre 17-06, pour une période de deux ans, est abrogé.

Art. 3. - Au chapitre 17-06 (Analyses de biochimie portant sur les marqueurs sériques d'origine embryonnaire ou fœtale, dans le sang maternel, de risque accru de trisomie 21 fœtale), la phrase : « L'examen ne peut être pratiqué qu'à la 15^e, 16^e et 17^e semaine d'aménorrhée » est supprimée et remplacée par : « L'examen ne peut être pratiqué qu'au cours de la 15^e, 16^e, 17^e et 18^e semaine d'aménorrhée ».

Art. 4. - Au chapitre 17-06 (Analyses de biochimie portant sur les marqueurs sériques d'origine embryonnaire ou fœtale, dans le sang maternel, de risque accru de trisomie 21 fœtale), il est ajouté après : « - de l'attestation signée du médecin prescripteur qu'il a apporté à la femme enceinte les informations définies à l'article R. 162-16-7 du code de la santé publique » la phrase suivante : « - du consentement écrit de la patiente ».

Art. 5. - Au chapitre 17-06 (Analyses de biochimie portant sur les marqueurs sériques d'origine embryonnaire ou fœtale, dans le sang maternel, de risque accru de trisomie 21 fœtale), il est ajouté après : « 3. Le risque calculé pour la patiente » la phrase suivante

« Ce compte rendu ne peut être remis à la femme que par l'intermédiaire du médecin prescripteur. »

ANNEXE II

■ LOGICIELS UTILISÉS POUR LE CALCUL DE RISQUE DE TRISOMIE 21 FŒTALE

De nombreux logiciels ont été proposés pour déterminer le risque de trisomie 21 fœtale.

Une liste (non limitative) de produits commercialisés ou non en France fin 1997 est fournie dans le Tableau I.

Tableau I

Logiciels	Concepteur	Industriel distributeur
AFP-SMS	R. MACIEL	Abbott
aLPHA	LMS	---
BD Screensoft	M. WEIDMANN	---
DERMALOG	(Allemagne)	---
DIANASOFT	---	Biochem Immuno Systems
DOWNCALC	T. M. Reynolds	Chiron
Free b Screen	---	Cis Bio International
KICK OFF	M. Penney	
MULTICALC	---	EG&G
PRENATA	---	Ortho Clinical Diagnostics
PRENAT' Screen	---	Cis Bio International
PREN VAL II	(USA)	
PRISCA	S. Nachbaur	DPC France
SANTOSHA	---	Biomérieux et Boehringer Mannheim
SCREENLAB	(USA)	

Un logiciel repose sur l'emploi de fonctions et de méthodes statistiques. Cela concerne :

- la fonction donnant le risque lié à l'âge ;
- l'association des marqueurs sériques prise en compte ;
- la datation de la grossesse au jour du prélèvement ;
- la transformation des concentrations des marqueurs sériques en MoM ;
- les facteurs de correction pour certains paramètres.

Lors du calcul de risque, plusieurs méthodes statistiques peuvent être utilisées : fonction discriminante, régression logistique ou rapport de vraisemblance.

Méthodes statistiques

Le rapport de vraisemblance (ou likelihood ratio) est la méthode la plus fréquemment employée.

l- Rapport de vraisemblance

Cette méthode a été appliquée par Cuckle et Wald en 1987 en utilisant comme paramètres l'AFP et l'âge maternel (l'AFP est systématiquement dosée en Grande-Bretagne pour la

recherche des anomalies de fermeture du tube neural). Elle consiste à pondérer le risque lié à l'âge de la patiente en le multipliant par un rapport calculé à partir des taux sériques d'un ou de plusieurs paramètres biologiques en utilisant la distribution de ces mêmes paramètres dans les grossesses normales et dans les grossesses avec trisomie 21. La formule de ce « ratio » est la suivante pour une seule variable :

$$L.R. = \frac{E_{tn}}{E_t} \text{ Exp} - \frac{1}{2} \left(\frac{(\text{Log}X - \text{LogMed}_t)^2}{E_t^2} - \frac{(\text{Log}X - \text{LogMed}_n)^2}{E_n^2} \right)$$

X : variable (hCG, AFP, hCG/AFP,...) exprimée en MoM

Med_n : Médiane de la distribution des normaux

Med_t : Médiane de la distribution des trisomiques 21

E_n : Écart-type de la distribution des normaux

E_t : Écart-type de la distribution des trisomiques 21

Cette équation est utilisable si la distribution de la variable testée suit une loi de Gauss. Il en est ainsi de l'hCG et de l'AFP après transformation logarithmique (voir l'article de J.-F. Morin : Comparaison de différentes procédures d'évaluation du risque de trisomie 21 fœtale par les paramètres biologiques hCG et AFP, dans *Immunoanal. Biol. Spec.*, 1996, 10 (6), 347-354).

2- Régression logistique

Cette approche a été entreprise par différents auteurs. L'établissement des formules de régression tient compte essentiellement des valeurs prédictives. A titre d'exemple, F. Muller prend en compte dans une équation l'âge de la patiente et le taux d'hCG exprimé en percentile. La formule dans laquelle p est le risque de trisomie 21 fœtale, est la suivante :

$$p = 1 - \frac{1}{1 + e^{-(395 + 0,48 \text{ Age} - 0,01 \text{ Age}^2 - 0,05 \text{ hCG})}}$$

3- Détection discriminante

Il s'agit d'approches statistiques utilisant des jeux de données ajustées. Un exemple d'application, pouvant aboutir à des présentations tridimensionnelles est fourni dans l'article de M. I. Evans : MoMs and DADs (Discriminant Aneuploidy Detection) : improved specified and cost-effectiveness of biochemical screening for aneuploidy. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 1995, 172 (4), 1138-1149.

Bases de données

Une des difficultés rencontrées pour harmoniser les résultats des calculs fournis par les différents logiciels réside dans l'hétérogénéité des bases de données. Les bases de données sont constituées par des mesures faites antérieurement sur des patientes à grossesse « normale » ou à grossesse « trisomie 21 ». Les paramètres permettant le calcul de risque sont

estimés à partir de ces mesures. Afin que soit assurée et reconnue la fiabilité d'un logiciel, il est nécessaire que ces bases répondent à un certain nombre d'exigences.

La situation idéale, ou pour le moins la plus simple, serait celle où tous les paramètres intervenant dans le calcul de risque auraient été déduits d'une étude prospective unique, d'effectif suffisant : en particulier les concentrations et donc les médianes obtenues auraient été mesurées avec les réactifs actuellement utilisés par le biologiste pour faire cette évaluation de risque ; il en serait de même pour les écarts-types des distributions des MoM.

Cependant si l'obtention d'une base de données « normales » performante est relativement aisée, il est bien connu que, par contre, celle de données « trisomies 21 » est autrement plus délicate : l'effectif est toujours trop faible ; c'est pourquoi il est fréquent de faire appel à plusieurs études indépendantes (méta analyse) ayant utilisé des réactifs différents.

Le logiciel peut donc faire référence soit à une cohorte de patientes constituant une seule base de données, soit à plusieurs cohortes de patientes constituant ainsi plusieurs bases de données. Les réactifs utilisés sur la base de données pourront être ceux proposés par le fabricant, mais peuvent être des réactifs d'origines différentes. Les médianes par S.A. constituent l'un des points sensibles des logiciels : leur rôle est d'obtenir les MoM utilisés dans les fonctions de calcul de risque ; trois autres grandeurs sont également importantes : l'estimation de l'écart-type des MoM dans la population « normale » et les estimations de la médiane et de l'écart-type des MoM dans la population « trisomie 21 ».

On trouvera ci-après les conditions à respecter par les industriels désirant enregistrer à l'ADM un ensemble (LOGICIEL - RÉACTIFS). Il importe de donner un descriptif aussi précis que possible de l'origine et du contenu des bases de données auxquelles il fait référence.

1- Le logiciel fait référence à une base « normaux - trisomies 21 » issue d'une étude unique

On doit indiquer nécessairement :

- en quelle année l'étude a été réalisée ;
- les références des réactifs utilisés pour les dosages des marqueurs ;
- s'il s'agit d'une étude prospective ou d'une étude rétrospective sur sérothèque (dans ce dernier cas, préciser les conditions et la durée de conservation des prélèvements) ;
- l'époque et la période sur laquelle les marqueurs ont été dosés.

On doit donner un descriptif statistique détaillé :

- de l'échantillon « normaux » : effectif et âge moyen des femmes par S.A., moyennes, écarts-types, médianes des concentrations et des MoM par S.A. ;
- de l'échantillon « trisomies 21 » : effectif, âge moyen des femmes, moyennes, écarts-types, médianes des concentrations et des MoM ;
- donner les valeurs des médianes des concentrations pour chaque semaine d'aménorrhée.

Dans le cas des grossesses « normales » l'effectif doit être au moins de 500 femmes par semaine d'aménorrhée (effectif nécessaire pour une estimation précise des médianes uti-

lisées à la transformation des concentrations en MoM). Il est souhaitable que cet effectif soit uniformément réparti sur la semaine.

Il faut indiquer :

- si les caractéristiques de position et de dispersion ont été calculées sur des données tronquées ; si c'est le cas, préciser pourquoi et comment ;
- un intervalle de confiance pour ces caractéristiques ;
- comment ont été extraits et exploités les facteurs de correction (poids, tabagisme, ethnie...) ;
- le nombre de dossiers sans issue de grossesse (il est souhaitable que ce nombre n'excède pas 20 %).

On doit fournir la référence de la base sur laquelle repose le calcul du risque lié à l'âge.

2- Le logiciel fait référence à des bases de données d'origines diverses

L'industriel doit fournir :

- les références précises des différentes études concernant ces bases ;
- un tiré à part des publications correspondantes ;
- un résumé clair des résultats de ces différentes études (on pourra reprendre les points du paragraphe précédent pour chacune d'entre elles).

Il précisera tout particulièrement comment on été obtenues, compte tenu de ces diverses sources :

- la fonction de calcul de risque lié à l'âge ;
- la méthode permettant le calcul des risques déduits des MoM ;
- les caractéristiques de position (moyennes, médianes) et de dispersion (écarts-types) pour les « normaux » et « trisomies 21 » utilisées par le logiciel.

Puisque la plupart des caractéristiques du logiciel sont issues d'études diverses :

- on prendra soin de décrire la démarche de la « méta analyse » effectuée ;
- et l'on indiquera très précisément comment ont été combinés des paramètres issus de différentes sources.

Référence : Agence du Médicament (juillet 1997) : Conditions d'enregistrement des réactifs et de validation des logiciels destinés à l'évaluation du risque de trisomie 21 fœtale à l'aide des marqueurs sériques maternels.

ANNEXE III

■ LE CONTRÔLE DE QUALITÉ DES MARQUEURS SÉRIQUES UTILISÉS POUR LE DIAGNOSTIC PRÉNATAL

Depuis plusieurs années, le Dr B . Digeon et son équipe du service de Biochimie du Centre Hospitalier de Chambéry organisent un contrôle de qualité.

Leur activité porte :

- sur le contrôle permanent ;
- sur la variabilité interlaboratoire globale ;
- sur la reproductibilité entre laboratoires utilisant le même réactif ;
- sur la variabilité des risques calculés à l'aide des différents logiciels.

Le tableau I compare les valeurs absolues des concentrations d'hCG et les CV obtenues avec 11 réactifs. On peut remarquer que les concentrations d'hCG varient de 27,1 à 43,5 U/ml (d'où l'importance d'une expression en MoM - multiple de la médiane).

Tableau I : Valeurs absolues (m U/ml) observées pour l'hCG à l'aide de 11 réactifs
(données diffusées le 14.2.1998 ; pas de troncature)

Méthode	Nombre de laboratoires	Nombre de dosages	Moyenne	ET	CV
ABBOTT	5	34	40 879	2 490,19	6,09
ACS CHIRON	11	60	43 516	1 830,37	4,21
AMERLEX	6	40	35 830	3 522,83	9,83
AMERLITE	4	36	32 667	1 554,53	4,76
BIOCHEM	2	20	30 709	2 163,11	7,04
CIS IRMA	3	16	27 175	1 643,37	6,05
DELFLIA	7	74	29 980	1 983,49	6,62
MEDGENIX	1	9	40 878	3 049,49	7,46
SFRI	1	4	38 250	4 112,98	10,75
VIDAS (BioM)	1	12	34 733	1 795,61	5,17
VITROS	1	3	28 033	472,57	1,69

Le tableau II concerne les valeurs absolues d'AFP (ici les concentrations varient de 32 à 47,8 mU/ml) .

Tableau II : Valeurs absolues (m U/ml) observées pour l'AFP à l'aide de 11 réactifs (données diffusées le 14.2.1998 ; pas de troncature)

Méthode	Nombre de laboratoires	Nombre de dosages	Moyenne	ET	CV
ABBOTT	5	34	33,82	2,96	8,74
ACS CHIRON	11	59	36,83	3,68	10,00
AMERLEX	6	41	38,07	3,90	10,24
AMERLITE	4	36	35,21	1,42	4,03
BIOCHEM	2	20	38,16	1,20	3,15
CIS IRMA	3	23	32,10	3,03	9,43
DELFLIA	13	112	34,23	2,20	6,42
SFRI	1	4	32,00	2,16	6,75
STRATUS-Dade	1	8	47,80	2,28	4,76
VIDAS (BioM)	1	12	35,47	1,67	4,70
VITROS	1	3	32,20	1,23	3,82

Les tableaux III et IV expriment les valeurs en MoM pour l'hCG et l'AFP.

La figure 1 renseigne sur les valeurs des risques calculés par les différents logiciels à partir des mêmes données (concentrations fournies en MoM) (sérum enquête de septembre 1997).

- **Tableau III** : Marqueurs de risque trisomique
 Contrôle enquête : Septembre 1997
 (données communiquées le 01.12.97 par B. Digeon)

hCG 40 résultats sur 68 inscrits hCGβ libre 13 résultats sur 68 inscrits

	hCG totale	β libre
SFRI		
n	4	
x (MoM)	1.17	
Et (Mom)	0.06	
CV (%)	5.25	
DELFA		
n	6	9
x (MoM)	1.15	1.42
Et (Mom)	0.14	0.09
CV (%)	11.9	6.20
J & J AMERLITE		
n	8	
x (MoM)	1.05	
Et (Mom)	0.07	
CV (%)	6.40	
BIOCHEM		
n	4	
x (MoM)	0.96	
Et (Mom)	0.13	
CV (%)	13.4	
CHIRON		
n	10	
x (MoM)	1.28	
Et (Mom)	0.15	
CV (%)	12.0	
CIS-BIO		
n	1.26	4
x (MoM)	<i>(résultats bruts)</i>	1.20
Et (Mom)		0.30
CV (%)		24.9
AMERLEX (résultats bruts)	1.07 0.95 0.93	
Techniques diverses (résultats bruts)	1.01 1.16 0.91 1.04	

Tableau IV : Marqueurs de risque trisomique
Contrôle enquête : Septembre 1997
(données communiquées le 01.12.97 par B. Digeon)

AFP 53 résultats sur 68 inscrits

	AFP
J & J AMERLITE	
n	8
x (MoM)	0.58
Et (Mom)	0.04
CV (%)	6.55
BIOCHEM	
n	4
x (MoM)	0.52
Et (Mom)	0.04
CV (%)	6.7
CHIRON	
n	10
x (MoM)	0.58
Et (Mom)	0.07
CV (%)	11.7
CIS-BIO	
n	5
x (MoM)	0.68
Et (Mom)	0.12
CV (%)	17.0
DELFA	
n	15
x (MoM)	0.58
Et (Mom)	0.06
CV (%)	9.76
SFRI	
n	4
x (MoM)	0.47
Et (Mom)	0.13
CV (%)	26.7
AMERLEX (résultats bruts)	0.69 0.3 8 0.6
Techniques diverses (résultats bruts)	0.58 0.62 0.56 0.79

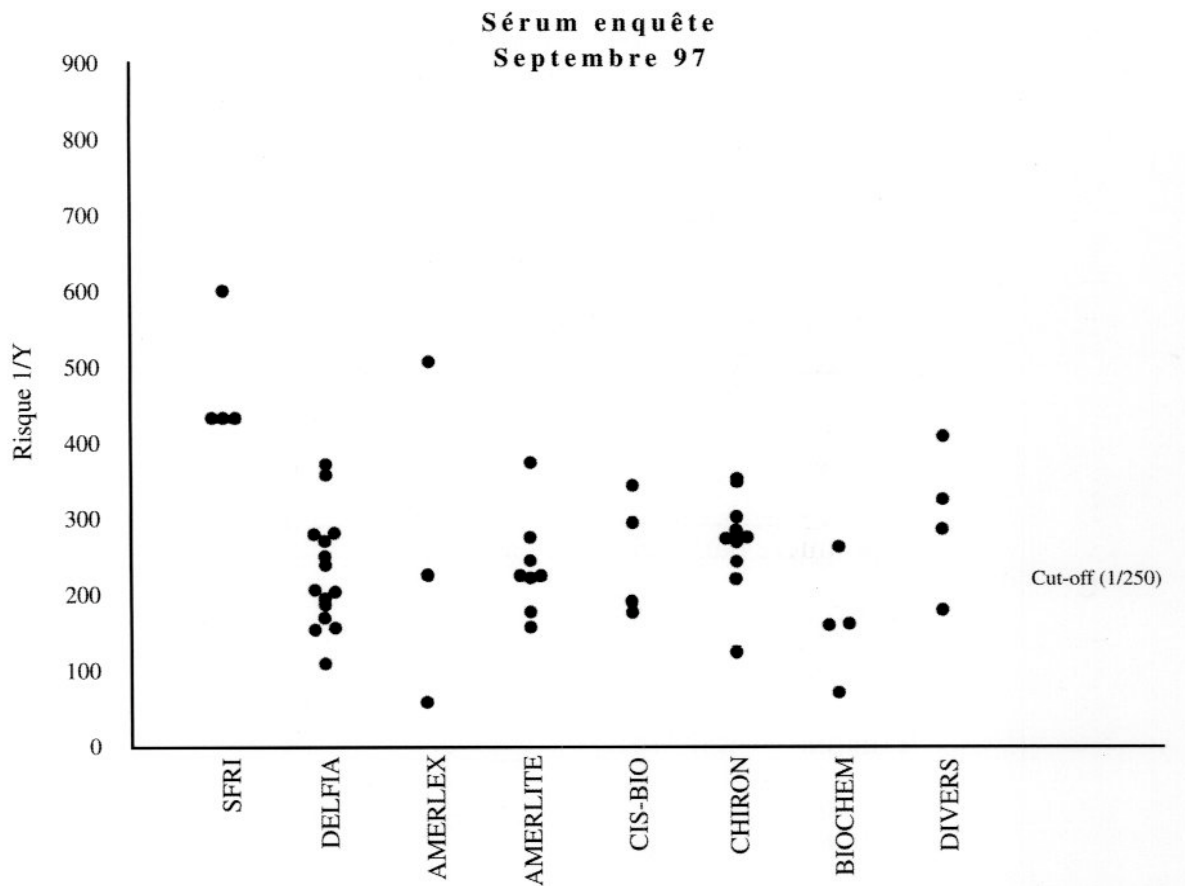


Figure 1 : Valeurs des risques calculées par les différents logiciels à partir d'un même sérum caractérisé par des concentrations fournies en MoM (sérum enquête préparé par B. Digeon en septembre 1997).

Commentaire

Le nombre important de couples (réactifs + logiciels) est à l'origine des difficultés d'harmonisation des performances. Les autorités de tutelle (Direction Générale de la Santé et Agence du Médicament) ont pris un certain nombre de mesures qui devraient porter leurs fruits à partir de 1999 :

- enregistrement des réactifs et des logiciels soumis à un respect de spécifications bien définies ;
- mise en place d'une réactovigilance ;
- suivi des activités de biochimie conduisant à un caryotype, IMG ou à un faux négatif (voir ci-après le texte adressé par la D.G.S. aux laboratoires agréés) (Tableau V).

Tableau V : Biochimie : marqueurs sériques maternels
 Bilan annuel d'activité (enquête DGS)

1- Dosages effectués pour l'estimation du risque de trisomie 21

(ou d'autres anomalies chromosomiques)

Groupe selon l'âge maternel	Nombre total de femmes testées (1)	Seuil de risque 1/250 (2)			
		Nombre femmes à risque (2-1)	Nombre amniocentèses effectuées (2-2)	Anomalie chromosomique (2-3)	
				Trisomie 21 (2-3-1)	autres (2-3-2)
< 20 ans					
20-24 ans					
25-29 ans					
30-34 ans					
35-37 ans					
>38ans					
TOTAL					

Avez-vous connaissance d'enfants trisomiques 21 dont la mère, tout en ayant un risque supérieur à 1/250,

n'a pas souhaité une amniocentèse (3) oui non

si oui, en préciser le nombre

Nombre de faux négatifs (trisomie 21 seulement) dont vous avez eu connaissance :

inclure tous les cas au-dessous du seuil de 1/250

(que le diagnostic ait été fait après la naissance ou in utero à la suite d'une échographie ou d'une amniocentèse de sécurité) (4)

2- Anomalies recherchées par ces tests en dehors de la trisomie 21 (5)

Recherchez-vous d'autres anomalies : oui non

si oui : malformations du tube neural

autres préciser :

Note explicative du tableau v (enquête DGS)

1- **Nombre total de femmes ayant eu un dosage de marqueurs sériques.**

2- **Pour les femmes dont le seuil de risque était égal ou supérieur à 1/250, préciser :**

2-1- le nombre de femmes pour lesquelles une amniocentèse était conseillée,

2-2- le nombre d'amniocentèses réellement effectuées,

2-3- le nombre d'anomalies chromosomiques dépistées en indiquant

2-3-1- le nombre de trisomies 21

2-3-2- le nombre d'autres anomalies chromosomiques.

3- **Certaines femmes n'ont pas souhaité bénéficier d'une amniocentèse bien que leur risque ait été estimé supérieur à 1/250** ; quelques-unes attendaient des enfants trisomiques 21 dont vous avez eu connaissance.

4- Indiquer **le nombre de trisomies 21 pouvant être considérées comme des faux négatifs** de la méthode : il s'agit d'enfants trisomiques 21 attendus par des femmes alors que le risque avait été estimé au-dessous du seuil de 1/250. Ces trisomies 21 sont découvertes soit in utero devant des signes échographiques ou après une amniocentèse de sécurité, soit uniquement à la naissance. Préciser les circonstances du diagnostic.

5- Si, à **partir des marqueurs sériques vous estimez le risque pour d'autres anomalies** (taux d'alphafœtoprotéine ou AFP, par exemple pour les anomalies du tube neural), veuillez le préciser et donner des commentaires sur votre pratique.

Conclusion

Quel que soit le soin apporté par les industriels et les autorités compétentes en matière de santé publique, la responsabilité du biologiste est directement engagée.

Ayant compris que le calcul d'un risque passe par la détermination de MoM, le biologiste doit exercer une surveillance sans faille de ses médianes établies pour chaque semaine d'aménorrhée entre 14 SA et 17 SA + 6 jours.

■ FICHES TECHNIQUES DE CYTOGÉNÉTIQUE

1- CULTURE DES CELLULES AMNIOTIQUES ET DES VILLOSITÉS CHORIALES

Principes

Les cellules se fixent et se multiplient sur un support de verre ou de plastique parfaitement propre et exempt de toxicité pour les cellules.

Deux méthodes sont utilisées :

- la technique in situ : les mitoses sont examinées directement sur le support de croissance cellulaire. On repère alors les cellules au sein des différentes colonies développées sur leur support ;
- la technique par trypsinisation : les cellules sont décollées de leur support par la trypsine avant les techniques de préparation chromosomique. On examine ainsi un mélange de cellules issues des différentes colonies.

Équipement requis

- Pièce dédiée à la culture cellulaire.
- Deux incubateurs à CO₂ indépendants.
- Une hotte à flux laminaire.
- Une loupe binoculaire.
- Un microscope inversé pour la surveillance des cultures.
- Une centrifugeuse.

Petit matériel et réactifs

De nombreuses firmes fournissent du matériel spécifique à la culture cellulaire

- 1) Le flacon de recueil est stérile et non toxique pour les cellules.
- 2) De nombreux types de récipients pour la culture cellulaire peuvent être utilisés : boîtes de Pétri en verre ou en plastique munies d'une lamelle de verre, boîtes compartimentées recevant des lames de verre, flacons...
- 3) Les milieux de culture sont adaptés à la culture des cellules amniotiques : milieux entièrement synthétiques, efficaces mais onéreux, mélanges de milieux et de sérum de veau fœtal...

Technique de culture des cellules amniotiques

Le prélèvement est centrifugé 10 minutes à 1 000 tours/minute et décanté. Les cellules sont reprises avec le milieu de culture dans le récipient de culture et placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère, enrichie de 5 % de CO₂, maintient le pH à 7,3.

Le milieu est renouvelé tous les trois jours à partir de J3.

Les cultures sont examinées au microscope inversé tous les deux jours à partir de J6

Les boîtes ou flacons contenant un nombre suffisant de colonies bien formées ou en formation sont sélectionnés pour le choc hypotonique et la récolte des mitoses (J6 à J12).

Technique de culture des villosités choriales

Les fragments de villosités sont recueillis dans du milieu de culture.

Le prélèvement est examiné à la loupe binoculaire afin d'éliminer au mieux le tissu maternel.

Les villosités triées sont incubées à 37°C dans une solution de collagénase IV pendant 40 minutes, puis dans une solution de trypsine-EDTA pendant 40 minutes.

Elles sont alors finement dissociées à l'aiguille et par pipetage énergique, reprises dans le milieu de culture et placées dans un flacon de culture à l'incubateur.

Le milieu est changé tous les deux jours à partir de J4.

Lorsque les cellules sont confluentes, on peut les décoller de leur support par de la trypsine-EDTA et les remettre en culture dans les boîtes de Pétri à lamelles pour le choc hypotonique et la fixation (technique in situ).

2- TRAITEMENT HYPOTONIQUE, FIXATION ET ÉTALEMENT

Matériel

- Incubateur à 37°C.
- Chambre humide climatisée ou humidificateur pour maintenir, dans la pièce, un taux d'hygrométrie autour de 50 % et une température de 20 à 25°C pendant le séchage des lames.
- Centrifugeuse pour la technique par trypsinisation.

A- Technique in situ

Petit matériel et réactifs

- Petite verrerie : boîtes de Pétri pour les lamelles ou boîtes compartimentées pour les lames.
- Solution hypotonique : par exemple, solution de Hanks diluée au 1/10 dans de l'eau à pH 7.
- Fixateur: éthanol/acide acétique 3/1.

Protocole

- J0 : les cultures sont sélectionnées pour la récolte des mitoses et le milieu est changé.
 - J1 : les lamelles ou lames sont transférées dans la solution hypotonique préchauffée à 37°C et placées dans incubateur pendant 15 minutes. À température ambiante, quelques gouttes de fixateur sont ajoutées au milieu hypotonique pendant 5 minutes.
- Les lames ou lamelles sont transférées dans un nouveau récipient contenant le fixateur et laissées 30 minutes. Elles sont enfin sorties du fixateur et mises à sécher en atmosphère humide.

B- Technique par trypsinisation

Petit matériel et réactifs

- Trypsine EDTA (prête à l'emploi).
- Tubes à centrifuger coniques.
- Solution hypotonique : idem.
- Fixateur : idem.

Protocole

- J0 : les cultures sont sélectionnées pour la récolte des mitoses et le milieu est changé.
 - J1 : vider les flacons et les rincer par quelques ml de trypsin EDTA.
- Remettre quelques ml de trypsin EDTA et placer à l'étuve à 37 °C pendant 5 à 10 minutes.
- Vérifier au microscope inversé que les cellules sont bien décollées de leur support et les transférer dans un tube à centrifuger.
- Centrifuger 5 minutes à 800 tr/mn et décanter.
- Remettre en suspension dans 7 ml de solution hypotonique.
- Après 25 minutes à 37 °C, centrifuger 5 minutes à 800 tr/mn
- Ajouter 3 ml de fixateur.
- Après 5 minutes, centrifuger de la même façon.
- Décanter et remettre 10 ml de fixateur ; laisser agir 30 minutes.
- Centrifuger à nouveau et décanter en laissant un peu de fixateur.
- Remettre en suspension et déposer deux gouttes de cette suspension sur des lames propres et sèches. Laisser sécher à l'air libre au moins 15 minutes.

3- CARYOTYPE SANGUIN

Matériel nécessaire

- Incubateur à 37°C.
- Centrifugeuse.

Réactifs

- Milieu de culture : RPMI 1640 ou TC 199 additionné de 5 % de sérum de veau fœtal, ou milieu synthétique.
- Phytohémagglutinine (PHA).
- Héparine.
- Mélange FRDU (0,5 µg/ml)-uridine (20 µg/ml)
- Solution de colchicine à 10 mg/l.
- Solution de thymidine (250 µg/ml).
- Milieu hypotonique (par exemple : sérum de poulain dilué au 1/6^e).
- Fixateur: mélange éthanol/acide acétique 3/1.
- Lames d'histologie parfaitement décapées.
- Flacons pour culture cellulaire.
- Tubes à centrifuger.

Protocole

Mise en culture

Le sang est recueilli stérilement sur héparine.

- J0 : mise en culture : 0,3 ml de sang fœtal dans 7,5 ml de milieu additionné de 4 gouttes de PHA et de 3 gouttes d'héparine dans un flacon de culture cellulaire. Incubation à 37°C.

Synchronisation des cultures

- J2 à 16 heures : ajouter 250 µl du mélange FRDU/uridine (blocage des divisions cellulaires).

- J3 à 8 heures 30 : ajouter 50 µl de thymidine (levée du blocage).

Incuber 5 heures 30 et ajouter 75 µl de colchicine (blocage des divisions cellulaires).

Incuber 30 minutes.

Choc hypotonique et fixation

Transférer dans des tubes à centrifuger coniques et centrifuger 10 minutes à 1 000 tours/minute.

Décanner et remplacer le milieu par la solution hypotonique préchauffée, remettre en suspension et incuber 15 minutes à 37°C.

Centrifuger 10 minutes.

Décanner puis remplacer la solution hypotonique par le fixateur et remettre délicatement en suspension à la pipette. Laisser en contact 10 minutes et répéter deux fois la fixation.

Centrifuger à nouveau et remettre en suspension les cellules dans le ml restant de fixateur.

Étalement

Laisser tomber de plusieurs centimètres de haut deux gouttes de la suspension cellulaire par lame. Laisser sécher et contrôler la concentration au contraste de phase. Si nécessaire recommencer en diluant ou en concentrant les cellules.

4- VILLOSITÉS CHORIALES : TECHNIQUE DIRECTE

La technique du caryotype « en direct » se fonde sur l'analyse des cellules du cytotrophoblaste en division spontanée.

Matériel

- Loupe binoculaire.
- Microscope inversé.
- Platine d'histologie ou « étaleur chauffant ».

Petit matériel et réactifs

- Milieu de culture : TC199 additionné de 5 % de sérum de veau fœtal.
- Solution de colchicine à 10 mg/l.
- Solution hypotonique (solution de Hanks diluée au 1/10).
- Fixateur: éthanol/acide acétique 3/1.
- Alcools décroissants : 100°, 70°, 50°, 30°.
- Acide acétique à 60 %.

Protocole

- J0 : les prélèvements villositaires sont vérifiés et triés sous la loupe binoculaire, puis placés dans une boîte de Pétri avec 5 ml de milieu de culture, dans une étuve à CO₂, à 37°C pendant une nuit.

- J1 : 1 goutte de solution de colchicine est ajoutée pendant une heure. Le milieu est alors aspiré à la pipette et remplacé par la solution hypotonique préchauffée pendant 10 minutes.

La fixation se fait en trois temps de 10 minutes.

Le fragment villositaire est réhydraté par des bains d'alcools décroissants de deux minutes jusqu'à l'eau.

Il est transféré dans quelques gouttes d'acide acétique à 60 % et la dissociation cellulaire est contrôlée au microscope inversé.

La suspension cellulaire est déposée sur une lame placée sur une platine histologique ou un étaleur chauffant et étalée par de lents mouvements de va et vient jusqu'à l'évaporation complète de la solution d'acide acétique.

5- COLORATIONS ET TECHNIQUES DE MARQUAGE CHROMOSOMIQUE

Matériel et réactifs

- Bain-marie précis au 1/10° de degré.
- Colorant de Giemsa R.
- Solution tampon de Sorensen à pH 6,7.
- Méthanol.
- Solution de Earle à pH 5,7 (pour le marquage R).
- Solution de trypsine à 0,25 % (pour le marquage G).
- PBS.

Coloration simple

- Solution colorante :
 - 3 ml de Giemsa R
 - 3 ml de tampon Sorensen
 - 94 ml d'eau
- Plonger les lames ou lamelles dans cette solution pendant 10 minutes.
- Rincer abondamment à l'eau et sécher.

Technique de marquage G (GTG)

- Les préparations sont « vieilles » quelques jours ou une nuit à 60°C.
- Plonger les lames ou lamelles dans la trypsine à 37°C pendant 15 secondes à une minute (tester pour ajuster chaque jour le temps d'action).
- Rincer au PBS .
- Colorer 7 minutes dans la solution suivante :
 - 3 ml de Giemsa R
 - 3 ml de méthanol
 - 94 ml de tampon Sorensen
- Rincer abondamment à l'eau et sécher.

Technique de marquage R (RHG)

- Placer les lames ou lamelles dans la solution de Earle au bain-marie à 87°C. Le temps d'incubation varie de 30 minutes à 1 heure 30 et doit être ajusté chaque jour. Il diminue avec l'âge des préparations.
- Rincer à l'eau froide et colorer 15 minutes dans la solution suivante :
 - 4 ml de Giemsa R
 - 10 ml de tampon Sorensen
 - 86 ml d'eau
- Rincer abondamment à l'eau et sécher.

EGOPRIM
30/32 rue du Couëdic - 75014 Paris

Juillet 1999
Dépôt légal juillet 1999

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-23-4

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : HÉMATOLOGIE | N° 15 : DÉPISTAGE |
| N° 2 : IMMUNOANALYSE | DE LA TRISOMIE 21 |
| N° 3 : PARASITOLOGIE | N° 16 : IMMUNO-ALLERGIE (2) |
| N° 4 : BACTÉRIOLOGIE | N° 17 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 5 : HORMONOLOGIE | A (VHA) et E (VHE) |
| GAZOMÉTRIE | N° 18 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS |
| N° 6 : G.B.E.A. | TOME II |
| N° 7 : IMMUNO-ALLERGIE (1) | N° 19 : VAGINITES ET VAGINOSES |
| N° 8 : HÉMOGLOBINES GLYQUÉES | N° 20 : HÉMOSTASE ET THROMBOSE |
| LIPIDES | N° 21 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 9 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS | B (VHB), DELTA (VDH), |
| TOME I | C (VHC), AUTRES |
| N° 10 : HÉMATOLOGIE | N° 22 : SYNDROME |
| CAS ILLUSTRÉS | DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES |
| N° 11 : AMIBES ET FLAGELLÉS | N° 23 : PARASITES SANGUINS |
| INTESTINAUX | N° 24 : BIOCHIMIE PEDIATRIQUE |
| N° 12 : LES MALADIES A PRIONS | N° 25 : LES MOISSISSURES |
| N° 13 : AUTOIMMUNITÉ | D'INTÉRÊT MÉDICAL |
| ET AUTOANTICORPS | |
| N° 14 : L'EXPLORATION | |
| DE LA THYROÏDE | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.