

*COLLÈGE NATIONAL  
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS  
Président : Docteur B. Maria*

**Extrait des  
Mises à jour  
en Gynécologie  
et Obstétrique**

—

**TOME XXIV  
publié le 30.11.2000**



*VINGT-QUATRIÈMES JOURNÉES NATIONALES  
Paris, 2000*

# Progrès récents en diagnostic prénatal : que reste-t-il des prélèvements invasifs du fœtus ?

C. D'ERCOLE<sup>1</sup>, A. LÉVY-MOZZICONACCI<sup>1,2</sup>, R SHOJAI<sup>1</sup>,  
L. PIÉCHON<sup>1</sup>, F. BRETELLE<sup>3</sup>, C. GIRE<sup>4</sup>, L. BOUBLI<sup>1</sup>  
(Marseille)

Le développement depuis 30 ans de techniques permettant une prise en charge de plus en plus performante du fœtus a fait émerger progressivement le concept de médecine fœtale. En matière de diagnostic, les progrès réalisés ont été possibles grâce à l'utilisation du monitoring cardiaque, de l'échographie-doppler, des techniques de prélèvement ovulaire et de l'analyse de la biologie fœtale. Il est actuellement souvent possible, grâce à ces méthodes, de porter un diagnostic précis et d'établir un pronostic.

Les progrès en médecine consistent à accroître les performances des moyens de diagnostic et de traitement tout en réduisant l'agressivité et les risques liés à ces méthodes. L'évolution de la médecine fœtale a bien illustré cette règle générale. La réalisation de prélèvements biologiques ovulaires a permis de réaliser un progrès fondamental en matière de diagnostic prénatal. Ce progrès a cependant eu un prix lié à la iatrogénicité de ces prélèvements, et en particulier au risque de perte fœtale. Étant donné la part importante de dépistage anténatal, le risque de perte fœtale concerne souvent des fœtus normaux.

1. service de gynécologie-obstétrique, hôpital Nord, Marseille
2. Service de biochimie, hôpital Nord, Marseille
3. service de gynécologie-obstétrique, hôpital de la Conception, Marseille
4. service de pédiatrie, hôpital Nord, Marseille

Suivant cette logique, les progrès réalisés au cours de ces dernières années ont été de plusieurs ordres :

- Meilleure pertinence dans l'indication du prélèvement invasif grâce à l'affinement des méthodes de dépistage de la pathologie fœtale et aux meilleures performances du diagnostic biologique;

- Développement de méthodes moins ou non invasives de diagnostic prénatal (DPN);

- Précocité du test et rapidité des résultats.

Nous proposons de faire une mise au point sur les progrès récents en diagnostic prénatal qui ont eu ou qui pourront dans un avenir proche avoir une influence sur les indications de réalisation et les informations apportées par les prélèvements fœtaux.

Les sujets abordés seront les suivants :

- dépistage des anomalies chromosomiques au cours du premier trimestre et leur influence sur les prélèvements ovulaires;

- apport de nouvelles techniques biologiques dans les méthodes invasives du diagnostic prénatal (dépistage rapide des anomalies chromosomiques fœtales par hybridation in situ fluorescente sur cellules amniotiques non cultivées, compléments du caryotype fœtal standard, biologie moléculaire et nouvelles techniques);

- méthodes non invasives : isolement des cellules fœtales dans le sang maternel;

- diagnostic préimplantatoire;

- biologie fœtale et pathologie infectieuse materno-fœtale.

## I. DÉPISTAGE DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES FŒTALES AU COURS DU PREMIER TRIMESTRE

Le dépistage de la trisomie 21 a été proposé au début des années 70, quand les techniques de laboratoire ont permis de déterminer le caryotype fœtal. Initialement, le dépistage était basé uniquement sur l'âge maternel et une amniocentèse était proposée aux patientes âgées de plus de 35 à 38 ans selon les pays. Ce groupe constituait environ 5 % de la population et permettait de dépister environ 30 % des trisomies 21. Il était estimé que ces patientes avaient un risque de 1/250 environ de donner naissance à un enfant trisomique et que ce risque était sensiblement identique au risque de perte fœtale par amniocentèse.

## PROGRÈS EN DIAGNOSTIC PRÉNATAL

À la fin des années 80, une nouvelle méthode de dépistage a été introduite. Elle prenait en compte non seulement l'âge maternel mais également la concentration de diverses molécules d'origine fœto-placentaire dans la circulation maternelle. À 16 SA, les valeurs sériques médianes de l'alpha-fœto-protéine, l'estriol et l'hCG (totale,  $\alpha$  libre et  $\beta$  libre) retrouvées en cas de trisomie 21 sont suffisamment différentes des valeurs médianes rencontrées au cours des grossesses normales pour permettre de sélectionner un groupe à haut risque. Cette méthode a montré sa supériorité par rapport à l'âge maternel seul dans le dépistage de la trisomie 21 : pour le même taux de tests invasifs (5 %), elle permet d'identifier 60 % (48 à 75 %) des fœtus trisomiques 21 (15, 47, 94, 106, 124).

Dans les années 90, certaines équipes ont proposé un dépistage en combinant l'âge maternel et la mesure de l'épaisseur de la clarté nucale (CN) entre 10 et 14 SA (84, 86, 107). Une étude récente de calcul de risque de trisomie 21 basé sur l'âge maternel et la mesure de la clarté nucale a été effectuée sur 96 127 patientes provenant de 22 centres. Les échographies de 10-14 SA avaient été effectuées par 306 opérateurs spécialement formés à ce type de dépistage et les données du dépistage informatisées grâce à un logiciel de calcul de risque mis au point par une étude pilote préalable (107). Environ 80 % d'anomalies chromosomiques fœtales pouvaient être dépistées au prix de 5 % de prélèvements invasifs fœtaux (tableau I).

*Tableau I*

*Dépistage d'anomalies chromosomiques basé sur la CN,  
âge maternel et âge gestationnel à partir de 96 127 patientes.  
D'après Snijders et al. (107)*

Caryotype	Total	CN > 95 <sup>e</sup> percentile	Risque $\geq$ 1/300
Normal	95476	4029 (4,4 %)	7907 (8,3 %)
Trisomie 21	326	234 (71,8 %)	268 (82,2 %)
Autres anomalies			
Trisomie 18	119	89 (74,8 %)	97 (81,5 %)
Trisomie 13	46	33 (72 %)	37 (80 %)
Turner	54	47 (87 %)	48 (89 %)
Triploïdie	32	19 (59 %)	20 (63 %)
Autre	74	41 (55 %)	51 (69 %)
Total	96127	4767 (4,9 %)	8428 (8,8 %)

Le dépistage des anomalies chromosomiques est donc possible dès le premier trimestre par l'échographie. La rentabilité de ce dépistage paraît actuellement supérieure à celle des marqueurs biologiques du deuxième trimestre. La limite principale de cette méthode réside en la nécessité d'opérateurs entraînés afin que leurs mesures soient reproductibles. L'utilisation de cette méthode en tant que test de dépistage à l'échelle de la population ne peut se concevoir qu'à travers une politique de formation des opérateurs et d'audit permanent des résultats.

### Dépistage combiné des marqueurs sériques et de la clarté nucale

Au cours du premier trimestre de la grossesse, lorsque le fœtus est porteur d'une trisomie 21, la concentration sérique maternelle de  $\beta$ -hCG libre est plus élevée et la concentration de PAPP-A (*pregnancy-associated plasma proteine A*) est diminuée par rapport aux taux retrouvés au cours de grossesses normales (1, 9, 13, 15, 16, 17, 53, 76, 77, 81, 87, 124, 125). Par contre, il n'existe pas de variation significative de la SP-1 (*Pregnancy-specific  $\beta$ -1 glycoprotein*) et de l'alpha-fœto-protéine (9, 15). Il n'existe pas de relation entre les taux sériques de la  $\beta$ -hCG libre, ou de la PAPP-A et la mesure de la CN, et ce, au cours de grossesses normales et des grossesses avec anomalies chromosomiques (16, 17). Il est donc possible de combiner les mesures sériques de la  $\beta$ -hCG libre, de la PAPP-A avec la mesure de la CN pour le calcul de risque des trisomies 21.

Plusieurs travaux montrent actuellement la possibilité d'associer l'âge maternel, la mesure de la clarté nucale et le dosage de marqueurs biochimiques sériques au cours du premier trimestre pour rendre le dépistage des anomalies chromosomiques fœtales plus performant (23, 24, 108, 114). Au cours d'une étude rétrospective, Spencer et al. (108) montrent que l'association de l'âge maternel, de la mesure de la CN et du dosage de la  $\beta$ -hCG libre et de la PAPP-A permet une sensibilité de 89 % dans le dépistage de la trisomie 21 pour un taux de faux positifs de 5 %.

La possibilité d'effectuer les deux tests dans un même temps avec obtention dans l'heure des résultats permettrait de réaliser un dépistage performant et unique au cours du premier trimestre.

Cette nouvelle stratégie de dépistage des anomalies chromosomiques fœtales a des conséquences directes sur les méthodes de diagnostic prénatal, tant sur le plan du prélèvement ovulaire que sur la technique d'analyse chromosomique.

En effet, la mise au point d'un dépistage du premier trimestre, justifie de proposer un diagnostic prénatal chromosomique à partir de 11-12 SA. À ce terme la culture de cellules fœtales à partir du liquide amniotique est plus difficilement réalisable du fait d'un taux plus important d'échecs de culture et les risques pour le fœtus liés à l'amniocentèse sont plus importants (26). Plusieurs études ont montré que l'amniocentèse précoce (avant 13 SA à 15 SA selon les séries) était associée à un risque accru de pertes fœtales, de pertes de liquide amniotique, d'excès d'anomalies fœtales à type de pied bot, d'échecs de ponction et d'échecs de culture (26, 56, 99, 101, 112) par rapport aux prélèvements effectués à un terme habituel (15 -16 SA). À ce terme, la biopsie de trophoblaste réalisée après 10-11 SA par voie abdominale est moins risquée que l'amniocentèse (85). Les anomalies décrites initialement et portant sur les extrémités et la face après biopsie de trophoblaste étaient relevées après des prélèvements précoces (< 10 SA) et n'ont pas été confirmées par d'autres études. La biopsie de trophoblaste transabdominale n'apparaît pas associée à un risque de pertes fœtales plus important que l'amniocentèse du deuxième trimestre (109). L'intérêt et les limites sur le plan biologique de la biopsie de trophoblaste seront discutés plus loin.

Par ailleurs, la mise en place d'un dépistage de masse des anomalies chromosomiques par des marqueurs biologiques et échographiques au premier et au second trimestre constitue une source de stress important pour le couple, liée en grande partie à l'attente de 1 à 3 semaines qu'impose la réalisation du caryotype fœtal du fait de la mise en culture des cellules amniotiques. Un résultat rapide peut être obtenu après biopsie de trophoblaste par une analyse des métaphases spontanées sans culture préalable qui permet un diagnostic en 24 heures (cf. infra). Une réponse rapide peut également être apportée par l'étude du liquide amniotique. Les données de la littérature (54) qui rapportent que 95 % des anomalies chromosomiques dépistées sont des aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y et la commercialisation de sondes fluorescentes dirigées contre ces chromosomes, qui montrent une spécificité et une sensibilité proches de 100 %, nous amènent à réfléchir sur la place que peuvent

jouer les techniques de cytogénétique moléculaire sur noyau interphasique dans le diagnostic prénatal. En effet, elles permettent d'obtenir un diagnostic de ces aneuploïdies en 24 à 48 heures. Nous décrivons cette technique en insistant sur ses avantages mais également ses limites en essayant de définir une stratégie concernant leur utilisation

## II. APPORT DE NOUVELLES TECHNIQUES BIOLOGIQUES DANS LES MÉTHODES INVASIVES DU DIAGNOSTIC PRÉNATAL

### A. Alternatives au caryotype fœtal obtenu par amniocentèse

#### *1. Le caryotype fœtal sur villosités choriales*

Le prélèvement de villosités choriales est né de la nécessité de trouver une méthode de prélèvement ovulaire plus précoce que l'amniocentèse permettant, lorsque le fœtus est anormal, une interruption de la grossesse du premier trimestre moins traumatisante physiquement et psychologiquement pour la mère.

Les cellules des villosités choriales dérivent de la même cellule ovulaire initiale. Les cellules fœtales et les cellules des villosités choriales ont donc les mêmes caractéristiques cytogénétiques et géniques. Les villosités choriales prélevées lors de la ponction sont formées de trois composantes : une couche externe formée par le syncytiotrophoblaste, une couche moyenne composée de cytotrophoblaste et une couche interne formée par un axe mésenchymateux dérivant directement du bouton embryonnaire. Une fois débarrassée des fragments de la caduque maternelle, la villosité choriale est un tissu d'origine zygotique. Une étude chromosomique directe peut être faite à partir des cellules cytotrophoblastiques qui ont la particularité d'avoir un index mitotique élevé et donc de permettre une analyse des métaphases spontanées sans culture préalable, ce qui permet un diagnostic en 24 heures. La culture cellulaire de villosités choriales permet également une analyse chromosomique fœtale ; le caryotype est alors obtenu à partir des cellules mésenchymateuses.

La nécessité de disposer d'une technique rapide pouvant être proposée tout au long de la grossesse avec un risque de fausse couche équivalant à celui de l'amniocentèse a amené certaines équipes à proposer ce type de prélèvement tout au long de la

grossesse, l'examen direct permettant d'avoir un caryotype fœtal en urgence.

En France, certaines villes comme Bordeaux, puis d'autres villes comme Marseille ont développé cette stratégie. En Europe une étude collaborative a été réalisée (EUCROMIC) et a contribué à souligner les problèmes d'interprétation que peut poser la présence de certaines anomalies chromosomiques retrouvées après analyse directe de villosités chorales (mosaïque confinée au placenta) et de discordances cytogénétiques fœtoplacentaires (DFP).

Le risque de DFP a été évalué environ à 1 % (54) et serait lié à un mécanisme de non disjonction post-zygotique très précoce qui n'intéresserait donc qu'un nombre restreint de lignées cellulaires (59, 60). Trois types de discordances fœto-placentaires ont été décrits :

- le type 1 correspond à une anomalie chromosomique en mosaïque concernant les cellules cytotrophoblastiques (retrouvé à l'examen direct);

- le type 2 correspond à une mosaïque chromosomique intéressant uniquement les cellules mésenchymateuses (culture de placenta);

- le type 3 correspond à une mosaïque intéressant à la fois les deux lignées placentaires étudiées.

Les conséquences d'une anomalie chromosomique confinée au placenta sur l'évolution de la grossesse et sur le pronostic de l'enfant à naître ne sont par encore clairement définies. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'extrême variabilité des conséquences cliniques de ces discordances fœto-placentaires. Pour certains auteurs, l'altération de la fonction placentaire est fonction du nombre de cellules anormales, pour d'autres c'est la nature du chromosome impliqué qui est en cause. Néanmoins il a été clairement montré à travers certaines observations (59, 60) que la présence d'un placenta diploïde retrouvé à l'examen direct maintenait dans 95 % des cas la survie pendant la grossesse de fœtus présentant une trisomie 13 ou 18. Par ailleurs, la présence d'une trisomie 16 à l'examen direct s'associant à un caryotype normal sur les autres lignées cellulaires s'accompagnait souvent d'un retard de croissance intra-utérin (68).

Récemment la possibilité d'une disomie uniparentale (DUP) a été avancée pour expliquer certains phénotypes anormaux associés à une trisomie sur examen direct de placenta et un fœtus diploïde sur culture de cellules mésenchymateuses ou culture de liquide amniotique ou de sang fœtal (130). La notion de disomie

uniparentale est très récente en génétique (33). Une cellule trisomique au départ peut perdre lors de divisions successives un des trois chromosomes homologues. Il peut arriver lors de la restauration de l'état diploïde que les deux chromosomes restants proviennent du même parent. La notion d'empreinte parentale est également une notion récente : un grand nombre de gènes doivent être obligatoirement représentés à la fois par l'allèle maternel et par l'allèle paternel pour assurer une fonction normale. Ainsi la disomie uniparentale par le biais de l'empreinte parentale peut avoir des conséquences malgré un caryotype apparemment normal. Ceci a été retenu pour certains chromosomes soumis à l'empreinte parentale : chromosome 15 (DUP 15 maternelle : syndrome de Prader Willi et DUP 15 maternelle : syndrome d'Angelman), chromosome 11 (DUP 11 paternelle : syndrome de Beckwith-Wiedemann), chromosome 7 (DUP 7 maternelle : syndrome de Silver-Russel), chromosome 6 (DUP paternelle : diabète néo-natal transitoire), chromosome 14 (DUP 14 maternelle : trouble de la croissance et puberté précoce, DUP 14 paternelle : dysplasie du squelette et déformation thoracique), chromosome 2 (DUP maternelle : retard de croissance intra-utérin et dysplasie pulmonaire) (31, 32).

L'ensemble de ces considérations nécessite de la part du biologiste en charge de l'analyse cytogénétique du prélèvement ovulaire une bonne connaissance de l'ensemble de ces données. Actuellement, du fait du risque de discordance fœto-placentaire, il est fortement conseillé d'associer à tout examen direct une culture de villosités choriales. Cette approche nécessite de la part du préleveur un effort particulier car la combinaison de ces deux techniques nécessite une quantité suffisante de matériel. Un échec de la culture est souvent directement lié à une quantité insuffisante de matériel prélevé ce qui est très préjudiciable pour la conclusion du caryotype fœtal. Afin de pallier ce problème, certaines équipes préfèrent associer à l'examen direct un prélèvement de liquide amniotique (35). Par ailleurs, la disomie uniparentale doit toujours être exclue lors de la découverte d'une anomalie numérique en mosaïque lors du prélèvement placentaire. Cette étude est réalisable en comparant sur le plan moléculaire, à l'aide des sondes génomiques très polymorphes, le prélèvement de placenta, le prélèvement de liquide amniotique et les prélèvements sanguins des parents afin de déterminer l'origine du chromosome impliqué. Dans tous les cas de discordance

foeto-placentaire, un conseil génétique et un suivi échographique sont par ailleurs indispensables.

## **2. La recherche d'aneuploïdie par hybridation in situ fluorescente sur cellules amniotiques non cultivées**

Les techniques classiques de culture de cellules amniotiques permettent d'obtenir un caryotype foetal entre 1 et 3 semaines selon les laboratoires. Depuis une dizaine d'années sont apparues de nouvelles méthodes issues de la biologie moléculaire qui permettent de réaliser un diagnostic rapide des principales anomalies chromosomiques.

### *a. Méthode*

La technique d'hybridation in situ utilisant des sondes génomiques fluorescentes (FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*) a complètement bouleversé le domaine de la cytogénétique et donc par la même occasion le diagnostic prénatal. L'hybridation in situ n'est pas une technique récente ; elle est utilisée depuis de nombreuses années dans les laboratoires de recherche. Ce qui a permis son essor ces dernières années est directement lié, d'une part au marquage de sondes qui se fait maintenant grâce à un fluorochrome et non un marqueur radioactif et d'autre part, à la commercialisation de sondes génomiques fluorescentes spécifiques d'une région chromosomique ou d'un chromosome donné. Des études collaboratives ont montré leur spécificité et leur reproductibilité permettant de les intégrer à une approche diagnostique. La technique est basée sur la propriété de l'ADN d'être constitué de deux brins complémentaires qui s'hybrident et se déshybrident à une température donnée. L'analyse d'un chromosome ou d'une séquence d'acides nucléiques donnée se fait par l'utilisation d'un fragment d'ADN complémentaire (sonde) de la séquence d'acide nucléique d'intérêt. La sonde et la préparation chromosomique sont à l'état de simple brin et la reconnaissance de la séquence d'intérêt par la sonde se concrétise par une hybridation des deux fragments complémentaires. Le marquage préalable de la sonde à l'aide d'un fluorochrome permet de la visualiser par détection à l'aide d'un microscope à fluorescence muni d'un filtre spécifique pour le fluorochrome utilisé. Cette technique est bien sûr possible sur chromosome en métaphase mais également sur noyau en interphase (à un moment du cycle cellulaire où l'ADN est complètement décondensé et où les chromosomes ne sont plus identifiables en tant que tels au microscope) : dans ce cas, les chromosomes ne sont

pas visualisés, seul est visualisé un signal coloré témoin de la présence du chromosome recherché. Cette possibilité offerte par la FISH a donc permis de se passer de l'obligation d'obtenir des mitoses et autorise l'étude du contenu chromosomique des cellules directement après leur recueil sans culture préalable.

Divers types de sondes sont utilisables sur des noyaux en interphase et sont caractérisés par leur taille et par les séquences particulières qu'elles reconnaissent. On distingue plusieurs catégories de sondes :

- Les sondes répétitives alpha satellites. Elles reconnaissent la région répétée péricentromérique. Leur avantage est l'obtention d'un signal assez volumineux lorsqu'elles sont utilisées sur noyau interphasique. Par contre, la taille du signal dépend du polymorphisme péricentromérique et peut être variable. De plus la spécificité de la sonde peut être liée aux conditions d'hybridation. La première sonde commercialisée dirigée contre le chromosome 21 était une sonde alphanucléotidique et l'utilisation n'en était pas aisée car les chromosomes 21 et 13 partagent les mêmes séquences répétées, ce qui rendait la distinction entre les deux chromosomes impossible. Actuellement les sondes commercialisées spécifiques du chromosome 21 sont des sondes cosmiques, comme celles dirigées contre le chromosome 13. Les sondes des chromosomes 18, X et Y sont des sondes alphanucléotidiques mais il n'existe pratiquement pas d'hybridation croisée entre les chromosomes qui pourraient être à l'origine de faux positifs. Winsor et al. (128) décrivent un cas de faux positif pour lequel la sonde alpha-satellite du chromosome X s'est hybridée sur le chromosome 19 dans le cadre d'un variant familial et rapportent une revue de la littérature de 5 cas sur une série de 10 000 analyses.

- Les sondes cosmiques. Elles ont une taille variable et sont dirigées vers des régions chromosomiques bien spécifiques. Elles ont l'avantage de donner un signal constant et très spécifique analysable sur noyau interphasique.

- Les sondes préparées à partir de chromosomes artificiels de levure (YAC) sont de taille supérieure aux sondes cosmiques mais semblent d'une rentabilité moins importante dans l'énumération des signaux dans cette approche que les sondes cosmiques (93).

Actuellement, un prélèvement de cellules fœtales par amniocentèse, ponction de sang fœtal ou même biopsie de trophoblaste peut être traité directement pour la FISH. Seule une fraction de ce prélèvement sera utilisée, le reste étant gardé pour établir une culture cellulaire.

Il y a encore quelques années, les sondes étaient fabriquées par certains laboratoires de recherche ce qui n'en favorisait pas la production ni la diffusion. Actuellement la plupart des sondes sont accessibles dans le commerce et des kits associant la détection des chromosomes les plus fréquemment associés à une anomalie sont disponibles (13, 18, 21, X, Y). Chaque chromosome est marqué avec un fluorochrome différent, ce qui permet de détecter l'ensemble des anomalies concernant ces chromosomes sur le même noyau à l'aide d'un microscope à fluorescence muni des filtres adéquats. Cette analyse ne nécessite qu'un échantillon de 2 à 5 ml de liquide amniotique et le résultat peut être rendu en 24 heures.

La réalisation de cette technique est aisée mais l'interprétation du résultat nécessite une bonne connaissance des techniques d'hybridation et une extrême rigueur. La préparation des cellules est une étape critique pour garantir la réussite de la technique FISH et permettre de donner un résultat fiable : en effet, un certain « bruit de fond », lié soit à un défaut d'hybridation des sondes, soit à leur accrochage non spécifique sur des structures cellulaires autres que les chromosomes cibles, risque de fausser l'interprétation finale.

Après évaluation de la qualité de la lame, il faudra sélectionner les noyaux analysables. Un minimum de 100 noyaux doit être compté, c'est-à-dire que pour chacun d'entre eux on comptera le nombre de signaux de couleurs différents. Le comptage permet d'établir un histogramme de distribution du nombre de cellules présentant 2 ou 3 signaux fluorescents. La normalité ou non du diagnostic dépend ensuite des valeurs généralement observées chez les fœtus à caryotype normal et chez ceux présentant effectivement une trisomie. Une majorité de noyaux par exemple plus de 90 % présentant sans ambiguïté 2 signaux autorise le médecin cytogénéticien à affirmer avec une quasi certitude que le nombre de chromosomes testés sera normal au moment où le caryotype final sera rendu. À l'inverse, le même pourcentage observé de cellules à 3 signaux fluorescents signe une probable trisomie (104). Tout dépend donc du nombre de faux positifs et faux négatifs générés par la FISH, taux qui ne peuvent être déterminés qu'après études portant sur de grands effectifs. Les études récentes montrent que cette technique possède une très bonne performance dans la détection d'anomalies chromosomiques ciblées. Eiben et al. (28) rapportent une expérience portant sur 3 150 analyses de liquide amniotique par FISH. Les amniocentèses avaient été pratiquées à partir de 12 SA jusqu'au 3e trimestre. Sur les 3 150 diagnostics

prénatals confirmés par les techniques classiques, toutes les trisomies 13, 18 et 21 ainsi que tous les cas d'anomalies gonosomiques avaient été diagnostiqués. Les auteurs rapportent cependant la même année (27) leur premier cas de faux négatif sur plus de 3 200 analyses effectuées. Selon les kits commercialisés en France, les résultats sont donnés pour fiables à 99,9 % (115).

Les limites de cette analyse sont, d'une part l'existence d'une aneusomie en mosaïque de diagnostic et d'interprétation délicate — il s'agit le plus souvent de mosaïques concernant les chromosomes X et Y —, et d'autre part la contamination des prélèvements par des cellules maternelles. Winsor et al. (129), rapportent un taux de 4 % de contamination maternelle. Pour Hockstein et al. (50) le taux de contamination des prélèvements par des cellules maternelles était de 2 %. Ce taux variait significativement en fonction des facteurs suivants : ponction transplacentaire (6 %), ponctions répétées (27,5 %) et l'expérience faible de l'opérateur (4,5 %). Le grand nombre de cellules analysées permet de minimiser le risque de faux négatifs qui supposerait une contamination massive par les cellules maternelles (104).

*b. Place de la FISH sur noyau interphasique dans le diagnostic prénatal des anomalies chromosomiques*

La FISH permet d'obtenir très rapidement un résultat fiable portant sur le diagnostic d'un certain nombre d'anomalies chromosomiques ciblées et comptant parmi les plus fréquentes.

Les difficultés de son utilisation sont actuellement de deux ordres :

- un des intérêts majeurs de ce type de technique est de guider l'attitude obstétricale dans les situations où le fœtus présente un risque important d'anomalie chromosomique et où il est important d'avoir un résultat rapide (grossesse avancée, souffrance fœtale, menace d'accouchement prématuré). Un diagnostic normal en FISH permet de rassurer partiellement en connaissant les limites de cette méthode (cf. infra). Ce qui peut poser encore plus de problèmes actuellement est la délivrance à l'obstétricien d'un résultat anormal. *L'American College of Medical Genetics* (5) recommandait en 1993 que la technique FISH sur amniocytes non cultivés soit considérée comme un test de recherche et que des actions irréversibles ne soient pas entreprises sur les résultats de la FISH seule. Actuellement, aucun résultat ne peut encore être suivi d'une proposition d'interruption médicale de grossesse car c'est toujours le caryotype final

qui est considéré comme la traduction exacte de la constitution chromosomique du fœtus (78). Il est donc indispensable que les données à partir de grandes séries confirment la fiabilité de la FISH et l'établissent comme une technique diagnostique à part entière de sorte que ses résultats puissent être pris en compte de façon formelle dans les décisions obstétricales ;

– la deuxième difficulté est liée au fait que la FISH ne permet pas d'éliminer complètement toute anomalie chromosomique comme le fait le caryotype fœtal standard. Une étude récente rapportée par Evans et al. (34) et portant sur 146 000 diagnostics prénatals a montré que seulement 70 % des anomalies chromosomiques retrouvées auraient pu être détectées par la FISH, utilisant les 5 sondes sur liquide amniotique non cultivé. Les autres concernaient des anomalies de structure, équilibrées ou non, et ne pouvaient pas être diagnostiquées par cette technique.

Lewin et al. (71), rapportent alors une sensibilité de 88,5 % variant de 94,6 % si l'on ne considère que l'âge maternel et d'environ 85 % si l'indication est un signe d'appel échographique ou les marqueurs sériques élevés. Cette différence de sensibilité en fonction de l'indication est également rapportée par d'autres auteurs (91,113) et correspond à la plus grande diversité des anomalies chromosomiques associées à la présence d'un signe d'appel échographique. La sensibilité est plus faible encore (73,4 %) lorsque le signe d'appel est de découverte tardive, après 34 SA (71).

Il apparaît donc que la rentabilité de la FISH est insuffisante dans les situations à haut risque et son intérêt ne vaut que par la rapidité des résultats permettant d'exclure 70 % des anomalies et en soulignant une fois encore les limites des décisions face à un résultat anormal. La rentabilité est meilleure dans le groupe des grossesses à faible risque d'anomalie chromosomique fœtale, groupe qui est largement majoritaire. Dans ce cas, la très grande majorité des anomalies chromosomiques sont des aneuplœidies et leur diagnostic est accessible à la FISH. Le problème est donc de savoir s'il est licite de se limiter dans ce groupe à la FISH seule ou s'il faut établir un caryotype complet.

## **B. Complément du caryotype fœtal standard**

Dans certaines situations de diagnostic prénatal chromosomique ou génique, l'analyse chromosomique isolée ne suffit pas à la mise en évidence d'une anomalie fœtale.

L'apport des techniques de cytogénétique moléculaire et de biologie moléculaire a modifié considérablement les investigations possibles dans ces cas. Ainsi, une meilleure caractérisation de micro-remaniements chromosomiques dans le cadre de translocations chromosomiques familiales équilibrées est possible avec une meilleure fiabilité. La prise en charge des signes d'appel chromosomique est également améliorée par la recherche possible d'un syndrome microdélétionnel ou d'une mutation génique s'associant à une pathologie malformative rentrant dans le cadre d'un syndrome génique.

## **1. Techniques de cytogénétique moléculaire**

### *a. Meilleure caractérisation des remaniements chromosomiques de petite taille*

Nous avons vu l'apport de la technique de FISH dans l'analyse des aneuploidies sur cellules non cultivées. Cette technique peut également être utilisée sur chromosomes en métaphase et permettre une analyse d'une ou de plusieurs régions particulières. À côté des sondes alphas et des sondes cosmiques déjà décrites précédemment, il existe d'autres types de sondes génomiques : les sondes télomériques qui sont spécifiques des extrémités des chromosomes, régions connues pour être le siège de remaniements chromosomiques, et des sondes de peinture chromosomique décrites précédemment. Ces sondes de grande taille permettent de reconnaître un chromosome entier. Il sera alors marqué d'une couleur particulière en fonction du fluorochrome utilisé.

Enfin, certaines sondes sont composées d'un mélange de séquences d'ADN marquées qui reconnaissent la totalité d'un chromosome, aboutissant à un marquage global d'une paire chromosomique donnée ou « peinture chromosomique » (*chromosome painting*). Ces dernières sont principalement utilisées dans le diagnostic des anomalies de structure équilibrées (translocations, insertions) et dans celles de certains chromosomes anormaux porteurs de fragments excédentaires dont l'identification n'est pas toujours possible par les techniques cytogénétiques classiques (104).

La technique de FISH multicolore à l'aide de 24 sondes différentes spécifiques des 22 paires d'autosomes et des chromosomes sexuels est très utile dans la prise en charge des remaniements chromosomiques complexes. Le panel de sondes

(alpoïdes, cosmidiqes, téloméridques, de peinture chromosomique) accessibles aujourd'hui dans le commerce pour tous les chromosomes permet une meilleure prise en charge de ces remaniements chromosomiques. Le coût élevé de ces sondes est un élément limitant dans l'utilisation plus large de ces outils.

*b. Recherche de syndrome microdélétionnel*

Certaines pathologies génétiques s'associent à une délétion moléculaire de quelques kilobases emportant certains gènes. La mise en évidence de cette anomalie sur le plan chromosomique ne peut pas se faire sur un caryotype standard et nécessite une approche de FISH sur chromosomes en métaphases en utilisant des sondes cosmidiqes, par exemple spécifiques de la région pouvant être délétée. Dans le cadre du diagnostic prénatal des pathologies micro-délétionnelles peuvent être suspectées comme la microdélétion du chromosome 4p s'associant avec le syndrome de Wolf-Wirshorn et la microdélétion 22q11 s'associant au syndrome de DiGeorge et au syndrome vélocardiofacial regroupés sous l'acronyme CATCH 22 (*Cardiac defect, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, hypocalcemia*).

Le syndrome de Wolf-Wirshorn (syndrome du 4p-) associe un retard mental, une dysmorphie associée à un retard de croissance très sévère. La mise en évidence d'un retard de croissance très sévère au cours de la grossesse sans aucune étiologie peut nécessiter la recherche d'une délétion du bras court du chromosome 4 par FISH en complément à un caryotype standard sur lequel cette anomalie peut tout à fait passer inaperçue.

La microdélétion du chromosome 22q11 s'associe à un spectre phénotypique très large dans lequel la cardiopathie de type conotruncal constitue le signe clinique le plus fréquent. En dehors de la cardiopathie qui conditionne en grande partie le pronostic, peuvent s'associer un déficit immunitaire, une hypocalcémie et des difficultés de langage et d'apprentissage ainsi que des troubles psychotiques qui alourdissent fortement le pronostic. La recherche systématique de cette microdélétion devant une cardiopathie fœtale a montré la présence de cette microdélétion dans 11,5 % des cas (69). L'indication de recherche de cette microdélétion doit être réalisée en fonction du type de la cardiopathie et des antécédents familiaux qui peuvent dans certains cas apporter certains éléments en faveur de ce syndrome microdélétionnel. Un avis génétique est indispensable dans ce contexte.

## 2. *Technique de biologie moléculaire*

Parmi les anomalies congénitales, approximativement 2/3 correspondent à des anomalies génotypiques et/ou environnementales. Les anomalies génotypiques résultent soit d'une mutation sur un seul gène (hérédité mendélienne ou monofactorielle), soit d'atteintes multigéniques et/ou environnementales (hérédité multifactorielle) (66).

Dans l'hérédité monofactorielle, une mutation concerne habituellement un seul locus. Le chromosome porteur du gène muté apparaît normal en cytogénétique car une délétion minimale ou la délétion d'une séquence nucléotidique sont invisibles. Dans ce cas, l'étude généalogique, la mesure des produits d'un gène (dosage d'une protéine spécifique, mesure d'une activité enzymatique) et l'analyse de l'ADN sont utilisées.

Il existe actuellement plus de 9000 affections monogéniques répertoriées; le diagnostic prénatal et le diagnostic de porteurs sains ne sont actuellement réalisables que pour quelques dizaines d'entre elles.

Les moyens du diagnostic prénatal seront différents selon que le gène est connu ou non, si la ou les mutations responsables de la maladie sont ou non caractérisées et s'il existe un polymorphisme de restriction (RLFP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*) lié au gène ou non. Un diagnostic direct peut être proposé si une mutation altère un site de restriction, si elle entraîne une délétion, ou si elle consiste en une mutation ponctuelle détectable par une sonde spécifique. À défaut, on posera un diagnostic indirect par étude de liaison avec un ou plusieurs RFLP liés à l'anomalie génétique entraînant la maladie. Une étude familiale est indispensable dans ce cas (66).

Les avantages de l'analyse de l'ADN sont l'accès aisé au matériel d'étude (liquide amniotique, trophoblaste, sang fœtal). L'expression d'un gène n'est pas requise pour l'analyse et n'importe quelle cellule nucléée de l'organisme peut être utilisée.

Le diagnostic prénatal par analyse de l'ADN fut effectué pour la première fois en 1976 (61). Les premiers diagnostics prénatals furent l'alpha-thalassémie, puis la drépanocytose en 1978, puis la bêta-thalassémie, l'hémophilie A et B, la myopathie de Duchenne, la phénylcétonurie, la mucoviscidose et la chorée de Huntington dans les années 80.

La prise en charge des signes d'appel échographiques a été également améliorée par la découverte de mutations ponctuelles associées de façon systématique à une pathologie génétique pou-

vant s'exprimer en période prénatale par la découverte d'une malformation à l'échographie. C'est le cas de certaines images digestives qui nécessitent d'éliminer un diagnostic de mucoviscidose. Un autre exemple est la possibilité actuelle d'apporter une certitude au diagnostic d'achondroplasie par amniocentèse. La confirmation moléculaire est réalisée par la mise en évidence de la mutation G380R du gène *FGFR3* qui code pour un récepteur de facteur de croissance fibroblastique (12). La cause de ce nanisme est une mutation unique du gène identifiable par étude moléculaire.

### 3. *Nouvelles techniques*

À l'interface des techniques de cytogénétique moléculaire et de biologie moléculaire est en train de naître une troisième génération d'outils biologiques qui sans aucun doute va bouleverser les laboratoires de diagnostic prénatal; il s'agit des techniques d'hybridation génomique comparative (CGH) et de « puce à ADN » (*microarray*) qui peuvent aussi se combiner (*CGH array*).

#### *a. L'hybridation génomique comparative*

La technique de CGH est basée sur le principe de la technique d'hybridation *in situ* mais dans ce cas l'hybridation se fait entre l'ADN du patient marqué à un fluorochrome donné (ex : couleur verte) et un ADN contrôle témoin marqué lui aussi à un fluorochrome donné (ex : couleur rouge). L'hybridation des deux ADN va entraîner la création d'une troisième couleur issue de la combinaison des deux précédentes (ex : jaune) si l'hybridation est normale. La présence d'une délétion moléculaire chez le patient se caractérisera par des régions d'ADN resté rouge, par contre une duplication d'une région particulière fera apparaître anormalement de la couleur verte. L'application de ces techniques connaît déjà un intérêt surtout dans le domaine de l'analyse des microremaniements (14) mais également dans la recherche d'anomalie chromosomique à partir du liquide amniotique non cultivé (64). Cette technique a l'avantage contrairement aux techniques de FISH de pouvoir diagnostiquer l'ensemble des anomalies chromosomiques (aneuploïdie et translocations chromosomiques).

#### *b. Les « puces à ADN »*

Le terme de puce à ADN fait référence à la fabrication d'un support dans lequel des séquences d'ADN d'intérêt de taille variable (8-25 nt à 100 pb) sont incorporées. Ces segments jouent le rôle de « sondes ». On incorpore un marqueur fluorescent à

l'ADN ou à l'ARN à analyser qui est déposé sur le support. Si une réaction d'hybridation a lieu, le marquage fluorescent sera retrouvé sur le support et signifie que la séquence d'intérêt (« sonde ») est présente dans l'ADN ou l'ARN étudié (46). Les domaines d'application de cette méthode sont multiples. On imagine aisément l'intérêt de cette technique dans le domaine du diagnostic prénatal où sur un même support pourraient être déposées des séquences d'intérêt de différents chromosomes, des régions délétées dans les syndromes micro-délétionnels et des séquences de gènes susceptibles d'être mutées dans certaines pathologies malformatives.

### III. IDENTIFICATION DES CELLULES FŒTALES DANS LE SANG MATERNEL

Depuis une dizaine d'années, un des axes de la recherche dans le domaine du diagnostic prénatal a pour but le développement d'une méthode non invasive de diagnostic prénatal basée sur l'isolement et l'analyse des cellules fœtales qui circulent dans la circulation maternelle. En effet, des cellules fœtales sont détectables à partir de la sixième semaine de grossesse (40). Au cours du premier trimestre, la proportion de cellules fœtales par rapport aux cellules maternelles est très faible et a été estimée à environ  $1/10^6$  à  $1/10^8$  de cellules (67). Cette quantité augmente de façon importante au cours de la grossesse pour arriver à terme à un total d'environ  $1/10^4$ . Le passage maximum de cellules fœtales a lieu lors de l'accouchement.

#### 1. Les différents types cellulaires

Différents types de cellules nucléées sont retrouvés dans la circulation maternelle : les cellules trophoblastiques, les leucocytes et les érythroblastes. Les cellules trophoblastiques ont été les premières cellules mises en évidence dans la circulation maternelle. Ce passage existe dès le premier trimestre de la grossesse du fait de l'invasion trophoblastique des vaisseaux utérins. Environ 100 000 cellules trophoblastiques passent chaque jour dans la circulation maternelle mais elles sont massivement

séquestrées lors de leur premier passage pulmonaire (105) et seulement une très faible quantité est retrouvée dans la circulation veineuse périphérique. De plus, l'identification des antigènes placentaires est difficile. Nous ne disposons pas d'anticorps monoclonaux très spécifiques pour les reconnaître. Les autres difficultés sont représentées par le fait que le diagnostic d'aneuploidie est gêné par le caractère multinucléé de certaines cellules trophoblastiques et enfin par l'existence de 1 % de mosaïque chromosomique limitée au placenta (19). Les lymphocytes sont produits tardivement par le fœtus et apparaissent vers 15 SA dans la circulation maternelle (52). Ils peuvent persister plusieurs années chez la mère et donc être présents lors de grossesses successives. Les antigènes de surface des lymphocytes fœtaux sont identiques à ceux des lymphocytes maternels adultes et leur repérage nécessite préalablement un phénotypage HLA du père (19, 111), ce qui est inapplicable pour un dépistage.

Les érythroblastes, cellules mononucléées précurseurs des globules rouges, sont produits par l'embryon dès 4-5 SA et sont présents précocement dans la circulation maternelle. Ils représentent actuellement les meilleurs candidats pour le diagnostic anténatal. Leur durée de vie est de 90 jours environ, ce qui exclut le risque de retrouver dans la circulation maternelle des érythrocytes provenant d'une grossesse précédente. Les érythroblastes fœtaux possèdent des antigènes marqueurs de la lignée érythrocytaire : glycophorine A, CD 36, CD 71, (récepteur de la transferrine) qui peuvent être identifiés grâce à l'aide d'anticorps monoclonaux (19). Par contre tous les érythrocytes nucléés retrouvés dans la circulation ne sont pas d'origine fœtale; il existe une petite population de cellules d'origine maternelle.

## 2. Facteurs influençant le passage cellulaire materno-fœtal

Certains facteurs influencent le passage de cellules fœtales dans le sang maternel.

- l'âge gestationnel;
- l'aneuploidie. Les cellules fœtales sont plus facilement détectées lorsque le fœtus est porteur d'une aneuploidie. Ce fait est peut-être lié à une anomalie placentaire ou à un défaut de maturation de la lignée érythrocytaire. L'expression du CD71 est accrue chez les fœtus porteurs d'une trisomie 21 (29);

– compatibilité érythrocytaire. En cas d'incompatibilité Rhésus entre la mère et le fœtus et d'immunisation maternelle, la quantité de cellules fœtales circulantes est diminuée proportionnellement au taux d'Ac anti-Rh. En revanche la compatibilité HLA materno-fœtale augmente le passage des cellules fœtales (19);

– prééclampsie et hypotrophie fœtale. Le nombre d'érythroblastes circulants est accru dans ces circonstances, ce qui témoigne peut-être du défaut de placentation. Al Mufti et al. (2, 3), à partir de prélèvements maternels réalisés à 22 – 24 SA, ont montré que le taux d'érythroblastes d'origine fœtale dans la circulation maternelle était plus élevé lorsque les Doppler utérins étaient pathologiques (4,5 % d'érythroblastes versus 1 % lorsque les Doppler étaient normaux). Ce taux était également plus élevé chez les patientes développant par la suite une prééclampsie ou un retard de croissance intra-utérin (5,5 % versus 2 % en absence d'anomalie);

– hémorragie fœto-maternelle;

– variations individuelles.

### 3. Isolement, tri et enrichissement des cellules fœtales

Du fait du faible nombre de cellules fœtales circulantes, un enrichissement de cette population est nécessaire avant tout diagnostic. Les techniques d'isolement des cellules fœtales sont basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes fœtaux. Leur spécificité et leur sensibilité sont déterminantes pour un tri efficace. Plusieurs anticorps peuvent être utilisés : anti-CD71, récepteur à la transferrine, anti-glycoprotéine A, anti-CD-36, anticorps dirigés contre la chaîne gamma de l'hémoglobine fœtale, anti-récepteurs à l'érythropoïétine. Une sélection négative est également possible et permet d'évaluer les cellules maternelles du prélèvement et de récupérer les cellules fœtales. L'anticorps anti-CD45 reconnaît l'antigène CD45 présent à la surface des leucocytes maternels (19). Les premières techniques de tri et d'enrichissement cellulaire utilisaient une approche par cytométrie de flux ou FACS (*fluorescent activated cell sorting*). Ces techniques sont toujours utilisées par certaines équipes mais il s'agit de techniques lourdes et difficilement applicables au diagnostic prénatal en routine. Une deuxième méthode beaucoup plus simple de tri cellulaire magnétique ou MACS (*magnetic activated cell sorting*) a été par la suite développée et

semble plus adaptée à une activité de routine. Cette technique utilise des billes magnétiques qui sont couplées à un anticorps spécifique des cellules érythrocytaires, l'anti-CD71 qui est dirigé contre le récepteur de la transferrine. L'isolement du complexe billes magnétiques-anticorps-cellule cible est possible après passage sur colonne munie d'un aimant. Afin d'optimiser la technique on préfère réaliser une séparation cellulaire sur trois gradients de sucrose de densité différente avant de procéder à l'enrichissement proprement dit.

#### 4. Diagnostic

Quelle que soit la technique d'enrichissement, une proportion importante de cellules maternelles persiste, rendant impossibles les techniques de cytogénétique classiques. Par contre une approche par technique de FISH ou par biologie moléculaire (PCR) est possible. Une reconnaissance des cellules fœtales par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'hémoglobine fœtale (HbF) précédera la technique.

La PCR a été appliquée pour obtenir un diagnostic de sexe, de génotype Rh D, de béta-thalassémie, d'hémoglobinopathie et de myopathie de Duchenne (19)

L'approche par multiFISH (sondes 13, 18, 21, X, Y) sur noyaux interphasiques est possible. La détection d'aneuploidie par ces méthodes non invasives est d'environ 40 à 60 % (4, 25). Al Mufti et al. (4) réalisent 230 prélèvements sanguins maternels à 10-14 SA avant prélèvement invasif pour caryotype fœtal. Le caryotype fœtal était anormal dans 80 cas avec 31 trisomies 21. En fixant un seuil de positivité à 3 % de cellules présentant 3 signaux, la sensibilité de la FISH pour détecter une trisomie 21 était de 97 % pour un taux de faux positifs de 13 %. Avec un seuil de 5 %, la sensibilité était de 61 % et la spécificité de 100 %. Des résultats similaires étaient obtenus pour les trisomies 18 et 13 en utilisant les sondes adéquates.

Ces résultats montrent qu'actuellement la recherche d'aneuploidie par isolement des cellules fœtales dans le sang maternel s'inscrit plus dans une démarche de dépistage que de diagnostic. Al Mufti et al. (4) estiment que l'utilisation combinée de cette technique, de l'âge maternel et de la mesure de la clarté nucale permettrait de dépister 80 % des trisomies avec un taux de prélèvements invasifs inférieur à 1 %.

## 5. Autres approches

À côté de l'isolement des cellules fœtales, d'autres approches sont réalisées également :

– Lo et al (73) ont montré grâce à des techniques de PCR quantitative permettant de mesurer la quantité d'ADN fœtal dans le plasma et le sérum maternel, que le plasma maternel contenait de grandes quantités d'ADN fœtal. Ces concentrations correspondent à une moyenne de 3,4 % du plasma total en début de grossesse et à une moyenne de 6,2 % en fin de grossesse. L'ADN fœtal peut être détecté dès 7 SA et sa quantité augmente dans le sérum maternel avec l'âge de la grossesse. Cet ADN est donc accessible aux analyses moléculaires telles que la PCR fluorescente quantitative qui permet de réaliser des diagnostics de pathologie génétique.

La présence de l'ADN fœtal dans le sang maternel permet actuellement de réaliser le génotypage fœtal RhD dans le sang des mères RhD négatif. Cette avancée est importante pour le suivi des patientes immunisées, pour le ciblage de l'immunoprophylaxie Rh anténatale et pour l'épargne de RAI prénatales. Lo et al. (72) rapportent une étude portant sur 57 patientes Rh D négatives. 39 fœtus étaient RhD + et 18 RhD-. 12 prélèvements avaient été réalisés au cours du premier trimestre, 30 au cours du second trimestre et 15 au cours du troisième trimestre. Les résultats de la détermination du groupe fœtal RhD par PCR sur sang maternel étaient tous exacts lorsque les prélèvements avaient eu lieu au cours des 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> trimestres. Parmi les 12 prélèvements réalisés au cours du premier trimestre, 2 fœtus étaient RhD + alors que le plasma ne contenait pas d'ADN RhD, les 10 autres prélèvements étaient concordants. Au cours d'une communication personnelle, Parnet-Mathieu et al. (88) ont rapporté récemment l'expérience du Centre d'Hémobiologie Périnatale. Le plasma de 182 femmes RhD- avait été testé. Les résultats de l'étude de l'ADN plasmatique maternel avaient été confrontés au phénotype érythrocytaire ou au génotype des amniocytes. 96 % des résultats étaient concordants. Les auteurs relevaient 3 faux positifs (1 contamination et 2 gènes RhD silencieux, 1 maternel et 1 fœtal); et 4 faux négatifs (défaut de sensibilité attribué 3 fois à l'action inhibitrice de l'héparine et 1 fois à la précocité de terme gestationnel : 6 SA avec un prélèvement positif ultérieurement, à 10 SA).

– Des cultures cellulaires fœtales ont été initiées à partir de prélèvements de sang maternel. Le but de cette recherche est de pouvoir proposer sur les cellules matures obtenues, la réalisation d'un caryotype fœtal (117). Cette approche est limitée par le fait qu'il existe également dans le sang maternel des cellules progénitrices maternelles qui se multiplient également. Bohmer et al. (11) proposent une méthode qui permet de différencier les cellules fœtales des cellules maternelles.

– Des techniques de micromanipulation ont également été introduites pour permettre d'isoler physiquement la ou les cellules fœtales et réaliser des analyses moléculaires par des techniques de PCR sur cellule unique (*single cell PCR*), de FISH et de CGH (Takabayashi et al. (110) et communication personnelle, Conférence Internationale de Diagnostic Prénatal, Barcelone, juin 2000).

En conclusion, l'isolement des cellules fœtales ou d'ADN fœtal dans la circulation maternelle constitue une voie de recherche très importante dans le domaine du diagnostic prénatal même si les retombées cliniques actuelles sont assez limitées compte tenu des outils biologiques par ailleurs disponibles. Néanmoins, il paraît possible d'envisager une politique de dépistage incluant ce type de technique afin de diminuer le nombre de prélèvements ovulaires invasifs.

#### IV. DIAGNOSTIC GÉNÉTIQUE PRÉIMPLANTATOIRE (DPI)

Le diagnostic génétique préimplantatoire est une forme très précoce de diagnostic prénatal. Il repose sur l'analyse du contenu génétique des embryons humains obtenus après fécondation in vitro (FIV) et permet donc de ne réimplanter dans l'utérus que les embryons ne présentant pas l'anomalie génétique recherchée. L'avantage de cette technique est de permettre aux couples à risque de transmettre une maladie génétique bien définie de débiter une grossesse sans la crainte d'avoir un enfant porteur de l'anomalie et d'éviter ainsi une interruption médicale de grossesse après diagnostic de pathologie par prélèvements ovulaires invasifs classiques (amniocentèse ou choriocentèse)

Les premières naissances consécutives à un DPI datent de 1990 au Royaume-Uni (49). Le DPI en France a été réglementé

par la loi de bioéthique L.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. Un arrêté de juillet 1999 a autorisé les premières équipes françaises à pratiquer cette technique. Actuellement, trois centres sont autorisés en France : à Paris : un centre constitué d'une association entre le centre de génétique de l'hôpital Necker-Enfants Malades et le centre de Biologie de la Reproduction de l'hôpital Antoine Béchère de Clamart, un centre au service de Biologie de la Reproduction de Strasbourg et un centre à l'hôpital Arnaud de Villeneuve à Montpellier.

La loi française stipule que le DPI s'adresse à des couples qui présentent une « forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité, reconnue comme incurable au moment du diagnostic. Le diagnostic ne pouvant être effectué que lorsque l'on a préalablement et précisément identifié, chez l'un des parents, l'anomalie ou les anomalies responsables d'une telle maladie ». Pour réaliser le DPI, une FIV est proposée au couple. Sur les embryons obtenus au 3e jour après la fécondation, à un stade théorique de 8 cellules, on prélève une ou deux cellules, ce qui n'affecte pas le potentiel de développement de l'embryon. L'analyse génétique permet ensuite de définir le statut génétique de l'embryon. Deux techniques permettent cette analyse : la PCR, qui permet de déterminer une anomalie génétique au niveau de l'ADN, et la FISH, qui permet de déterminer le nombre de chromosomes avec des marqueurs d'ADN fluorescents spécifiques des chromosomes. Seuls les embryons sains ou porteurs sains, en cas de maladies récessives, sont transférés dans l'utérus de la patiente (122).

Les maladies monogéniques les plus fréquentes pour lesquelles le DPI a été pratiqué sont (39, 119) :

– parmi les maladies liées à l'X : dystrophies musculaires de Duchenne ou de Becker, Hémophilie A, maladie de Wiskott-Aldrich, adrénoleucodystrophie, déficience en OCT, maladie de Menkes, retard mental lié à l'X, rétinite pigmentaire, neuropathie héréditaire sensitivo-motrice de type Charcot-Marie (CMTX), myopathie tubulaire ;

– parmi les maladies autosomiques dominantes, le DPI a été utilisé pour la chorée de Huntington, la maladie de Marfan, la dystrophie myotonique, la neuropathie héréditaire de type CMT, l'ostéogénèse imparfaite type I ;

– parmi les maladies autosomiques récessives : la mucoviscidose, le déficit en 21 hydroxylase, la thalassémie et la drépanocytose.

Enfin, les aberrations de structure chromosomique comme certaines translocations, délétions ont également été retenues parmi les indications du DPI.

Les recherches d'aneuploidie, interdites en France, sont proposées dans un nombre limité de centres d'AMP aux femmes incluses dans un protocole de FIV, qui, pour des raisons d'âge ou d'échecs répétés de FIV, présentent un risque élevé d'avoir des embryons présentant des anomalies de nombre des chromosomes. Une telle stratégie n'a pas encore fait ses preuves d'autant qu'il n'est possible d'analyser simultanément qu'un nombre limité de chromosomes (cinq à huit) (122).

Les difficultés liées au DPI sont donc, pour le couple, la nécessité de connaître de façon précise leur statut génétique, la possibilité de diagnostic biologique de l'anomalie et l'obligation de réaliser une FIV avec un taux de grossesses après transfert d'environ 20 à 30 %. Les difficultés pour le laboratoire résident dans la faible quantité de matériel biologique disponible, la minutie de la micromanipulation et le peu de temps imparti à la réalisation du DPI, l'ensemble du diagnostic devant être réalisé dans la journée du 3<sup>e</sup> jour après la fécondation (122).

Une enquête rapportant les données recueillies auprès de 16 centres sur une période allant de janvier 1997 à septembre 1998 a été récemment publiée (42). Durant cette période, 392 cycles de DPI avaient été réalisés pour 317 couples dont 302 avaient abouti à un transfert embryonnaire. 82 grossesses biochimiques avaient été obtenues, résultant en 66 grossesses cliniques et à la naissance de 79 enfants. Sur l'ensemble des 392 cycles, un faux diagnostic avait été rapporté.

## V. PATHOLOGIE INFECTIEUSE MATERNO-FŒTALE ET BIOLOGIE FŒTALE

L'infection maternelle par certains agents infectieux peut être responsable d'embryo-fœtopathies. Les agents infectieux viraux pour lesquels le risque est le mieux connu sont la toxo-

plasmosse, la rubéole, le cytomégalo­virus (CMV), le parvovirus B19 et la varicelle.

La recherche de contamination fœtale peut être envisagée dans deux contextes :

– La découverte d'une infection maternelle, symptomatique ou non, par un agent infectieux réputé dangereux pour le fœtus impose la recherche de signes échographiques ou biologiques fœtaux permettant d'une part d'évoquer la contamination fœtale et d'autre part d'évaluer son degré de sévérité. L'infection maternelle aura alors été diagnostiquée soit dans le cadre d'une surveillance sérologique systématique, soit en raison de signes cliniques maternels, soit enfin en raison d'un contexte favorisant la contamination maternelle.

– Au cours d'une étude échographique, certains signes font évoquer une possible infection fœtale. La recherche d'arguments en faveur de cette infection s'inscrit alors dans le cadre d'un bilan étiologique complet materno-fœtal.

Les prélèvements biologiques ovulaires ont deux rôles : affirmer la contamination fœtale et éventuellement constituer un argument du pronostic en cas d'infection fœtale. De façon générale, le prélèvement de sang fœtal a été très utilisé depuis une vingtaine d'années pour le diagnostic positif d'infection fœtale. Actuellement, le diagnostic d'infection fœtale est le plus souvent porté par étude du liquide amniotique (culture et biologie moléculaire). La ponction de sang fœtal est essentiellement discutée actuellement comme éventuel élément du pronostic en cas d'infection fœtale prouvée.

Nous analyserons pour chacune des principales infections materno-fœtales l'apport de la biologie fœtale au diagnostic prénatal et les indications de prélèvements ovulaires.

## A. Toxoplasmose

### 1. *Le contexte*

La primo-infection toxoplasmique concerne 4 900 femmes par an en France entraînant environ 100 infections congénitales. Le taux de transmission fœtale dépend du terme de la grossesse au moment de la contamination maternelle. Ce taux est < 5 % avant 5 SA et > 80 % en fin de grossesse (37). Environ 15 % des enfants contaminés in utero présenteront une pathologie sévère à la naissance (hydrocéphalie, chorioretinite, calcifications cérébrales).

85 % de ces enfants seront asymptomatiques à la naissance mais peuvent développer des séquelles ultérieurement en l'absence de traitement (45, 63, 127). Un traitement antiparasitaire instauré avant la naissance (spiramycine ou pyriméthamine/sulfamides) peut diminuer le risque d'apparition de séquelles ultérieures (38). Il est donc important de pouvoir disposer d'un diagnostic prénatal fiable pour établir le diagnostic d'infection, débiter un traitement adapté et orienter la surveillance et la prise en charge pré et postnatale.

## **2. Biologie fœtale et diagnostic prénatal**

Les méthodes de diagnostic prénatal proposées il y a plus de 10 ans associaient l'étude du liquide amniotique et du sang fœtal (22). Les analyses comportaient :

- une culture sur fibroblaste et une inoculation à la souris (LA et sang fœtal);
- une recherche des IgM totales (sang fœtal) et spécifiques antitoxoplasmiques (sang et LA);
- une recherche de signes non spécifiques d'infection fœtale dans le sang fœtal (thrombopénie, élévation des enzymes hépatiques).

La sensibilité de ces méthodes était cependant médiocre (22).

L'introduction de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pour détecter l'ADN du *Toxoplasma gondii* dans le liquide amniotique (LA) a permis par la suite un diagnostic plus rapide et plus précis (22, 36, 51). Les indications de la ponction de sang fœtal ont actuellement pratiquement disparu. La plupart des équipes recherchent l'atteinte fœtale par PCR sur LA, l'amniocentèse étant pratiquée habituellement avec un délai d'au moins 4 semaines par rapport à la date de l'infection maternelle. La gravité de l'infection fœtale et une éventuelle indication d'interruption médicale de grossesse reposent actuellement sur l'échographie (8) et éventuellement une IRM cérébrale fœtale.

Foulon et al. (37) rapportent les résultats d'une étude rétrospective réalisée à partir de 122 patientes infectées pendant la grossesse par le toxoplasme et ayant bénéficié d'un diagnostic prénatal. Les données provenaient de 6 pays européens. 31 enfants présentaient une infection. La sensibilité et la spécificité de la PCR sur LA étaient de 81 % et de 96 %. La sensibilité était de 91 % si une inoculation à la souris était associée.

Roman et al. (98) rapportent cette année une étude prospective réalisée sur 3 centres français (Paris, Lyon, Marseille). 272

patientes présentant une séroconversion perçavidique ont été incluses dans l'étude. Les données avaient été collectées entre 1996 et 1998. Le diagnostic prénatal était réalisé par PCR et inoculation à la souris du LA. L'amniocentèse était pratiquée après 18 SA et 4 semaines au moins après l'infection maternelle. L'infection fœtale était prouvée par persistance des IgG antitoxoplasmiques après un an. 77 (28,3 %) enfants étaient infectés et le diagnostic prénatal était positif dans 49 cas. La sensibilité globale était de 63,6, la valeur prédictive négative de 87,8 %, la spécificité et la valeur prédictive positive de 100 % ; parmi les cas de toxoplasmose congénitale, la valeur du diagnostic prénatal n'était pas différente en fonction du centre (Paris : 61.9 % ; Lyon 63,9 % ; Marseille : 69.2 %), de l'intervalle de temps séparant l'infection maternelle et l'amniocentèse et de la durée du traitement par la spiramycine précédant l'amniocentèse. La sensibilité de la PCR était cependant supérieure lorsqu'il s'agissait d'une infection survenant entre 17 et 21 SA (Tableau II). Il faut noter également que 3 faux négatifs de la PCR avaient été rattrapés par l'inoculation à la souris.

*Tableau II*

*Différences de sensibilité du diagnostic prénatal de la toxoplasmose en fonction de l'âge gestationnel au moment de la contamination maternelle (98)*

Âge gestationnel (SA)	Sensibilité (IC 95%)
4 à 16 SA	42,9% (17-68,8)
17 à 21 SA	92,9% (67,9-98,8)
≥ 22 SA	61,2% (47,6-74,8)

## **B. Rubéole**

### ***1. Le contexte***

Malgré la stratégie vaccinale introduite en France depuis 1983 et le fait que moins de 10 % des femmes en âge de procréer soient réceptives, l'infection rubéoleuse pendant la grossesse n'a pas disparu. La couverture vaccinale en France n'est pas satisfaisante et le problème de la rubéole chez la femme enceinte se pose épisodiquement. En 1992, l'incidence des infections

rubéoleuses en cours de grossesse était de 3,9 pour 100 000 naissances et celui des rubéoles congénitales malformatives de 0,26 pour 100 000 naissances (79).

## **2. Biologie fœtale et diagnostic prénatal**

Le diagnostic prénatal de contamination fœtale fait actuellement appel principalement à la biologie materno-fœtale et plus accessoirement à l'échographie.

L'infection fœtale peut être montrée par :

– la ponction de sang fœtal, réalisable à partir de 20-22 SA, qui va rechercher la présence du virus par amplification génique ou culture, la présence d'IgM spécifiques et l'existence de signes non spécifiques d'infection fœtale (élévation des IgM totales, anémie, thrombopénie, élévation des enzymes hépatiques, érythroblastose, présence d'interféron alpha) ;

– un prélèvement de liquide amniotique 5 semaines après la séroconversion maternelle pour recherche du génome viral par PCR.

En cas d'infection fœtale et si la grossesse est poursuivie, l'échographie devient alors primordiale dans la recherche de malformations liées à l'infection rubéoleuse. La littérature est pauvre en descriptions échographiques d'anomalies.

L'étude échographique devra s'attacher à la recherche d'un infléchissement de la croissance, de malformations cérébrales et cardiaques ainsi qu'aux signes d'infection non spécifiques : hépatosplénomégalie, augmentation de l'épaisseur du placenta, anomalie de la quantité de liquide amniotique.

## **C. Infection à CMV**

### **1. Le contexte**

Le CMV est responsable de la plus fréquente des infections virales congénitales puisque cette infection concerne 0,5 à 2 % des nouveau-nés. Elle constitue la cause principale des handicaps neuro-sensoriels acquis pendant la vie intra-utérine.

En cas d'infection fœtale in utero, les conséquences sont variables : à la naissance, environ 85 à 90 % des enfants sont asymptomatiques et 10 à 15 % présentent des symptômes divers.

– au cours des formes symptomatiques, qui sont presque exclusivement les conséquences d'une primo-infection maternelle, la moitié de ces enfants seront sévèrement atteints (avec dans ce groupe 30 % de décès et 60 % de séquelles neuro-senso-

rielles); l'autre moitié présentera des symptômes modérés (avec dans ce groupe 65-75 % d'enfants dont le développement sera satisfaisant, et 25-35 % qui présenteront des séquelles);

– au cours des formes asymptomatiques, le risque de handicap futur est estimé à 5 à 15 % après primo-infection maternelle. Il paraît d'autant plus important que l'infection a été plus précoce. Dans les infections récurrentes, il est encore plus faible, de l'ordre de 1 à 5 %, presque uniquement de surdité modérée (120).

Ces statistiques correspondent à l'ensemble de la littérature qui établit entre 10 et 20 % selon les séries le nombre d'enfants atteints qui garderont des séquelles neuro-sensorielles (118). D'après Vial et al. (120), en se basant sur un modèle de 770 000 naissances par an, on peut estimer que 2289 fœtus seront contaminés in utero et que 432 d'entre eux garderont des séquelles neuro-sensorielles.

## ***2. Biologie fœtale et diagnostic prénatal***

Le diagnostic positif d'infection fœtale se fait au mieux par prélèvement de liquide amniotique pour recherche du virus par culture ou PCR, après vérification de la négativité de la virémie maternelle et au moins 4 à 6 semaines après l'infection (séroconversion ou signes cliniques) maternels (55, 121). La ponction de sang fœtal a peu d'intérêt diagnostique. Elle pourrait peut-être apporter des arguments d'ordre pronostique en recherchant les anomalies hématologiques et hépatiques de l'infection. Ces anomalies sont le témoin d'une atteinte disséminée mais leur signification pronostique en anténatal n'est pas établie, même s'il semble exister une corrélation entre les anomalies biologiques et la fréquence des séquelles (75, 126).

En cas d'infection fœtale, le pronostic fœtal pourra donc être discuté avec des arguments échographiques et éventuellement biologiques.

Les données postnatales montrent que seulement 10 à 20 % des enfants sont symptomatiques et sont donc susceptibles de développer des anomalies décelables in utero. Il est cependant probable que seuls les fœtus présentant les atteintes les plus sévères présenteront des signes échographiques. L'échographie ne montrerait en pratique des signes d'infection que chez 5 % des enfants atteints (121).

La séméiologie échographique décrite par les différents auteurs comporte les signes suivants : retard de croissance intra-utérin, anomalies de la quantité de liquide amniotique, épanchements des

séreuses, hépatosplénomégalie, anomalies digestives (grêle hyperéchogène, péritonite méconiale), anomalies cérébrales (microcéphalie, porencéphalie, ventriculomégalies, hypoplasie du cervelet, lissencéphalie-pachygyrie, destruction cérébrale majeure, calcifications cérébrales). L'IRM cérébrale fœtale peut également être utile pour préciser le diagnostic de ces anomalies.

## D. Parvovirus B19

### 1. *Le contexte*

Ce virus est l'agent responsable du mégalérythème épidémique (ou 5<sup>e</sup> maladie chez l'enfant). Sa responsabilité dans l'anasarque non immunologique a été mise en évidence en 1984 (18, 62). Environ 50 % des femmes enceintes sont immunisées (78). Les patientes à risque sont les femmes en contact avec de jeunes enfants (mères de famille, personnel soignant, institutrices). Le risque pour une femme enceinte de contracter une infection à Parvovirus B19 au cours de la grossesse serait de 1 sur 400 environ (41). Après primo-infection maternelle, la contamination fœtale survient dans 1/3 des cas environ (48). Au cours de la grossesse, le virus peut provoquer des avortements spontanés, des morts fœtales in utero et des anasarques fœto-placentaires. La mort fœtale surviendrait dans environ 10 % des grossesses infectées (82, 116). L'infection par Parvovirus B19 serait responsable de 7 % (96) à 18 % (58) des anasarques non immuns.

### 2. *Biologie fœtale et diagnostic prénatal*

– En cas de découverte d'un anasarque au cours d'une échographie systématique, la recherche d'une infection par le parvovirus B19 doit faire partie du bilan étiologique. Le diagnostic peut être réalisé par amplification de l'ADN par PCR sur sang fœtal et liquide amniotique. Une ponction de sang fœtal permet d'évaluer le degré d'anémie fœtale et de proposer une transfusion fœtale. Bien que ce geste soit encore discuté en raison de la possible évolution favorable spontanée en cas d'anasarque lié au parvovirus B19 (97), la plupart des auteurs estiment qu'une transfusion in utero est indiquée en cas d'anasarque (92, 100, 102) pour compenser l'anémie fœtale aiguë responsable au moins en partie de l'insuffisance cardiaque. L'échographie permettra par la suite de surveiller la vitalité fœtale et l'évolution de l'anasarque.

– Certains signes échographiques en dehors de l'anasarque, notamment un épanchement isolé abdominal, pleural ou péricardique, une péritonite méconiale, doivent également faire évoquer la possibilité d'une infection à parvovirus B19 et inclure sa recherche dans le bilan étiologique.

– En cas de forte suspicion d'infection chez une patiente enceinte (séroconversion ou présence d'IgM), une étude échographique attentive à la recherche de signes de début d'anasarque est recommandée de façon hebdomadaire pendant 12 semaines (102).

## E. Varicelle

### 1. Le contexte

La varicelle est rarement une maladie d'adulte. 90 à 95 % des femmes en âge de procréer sont immunisées. Le risque de survenue d'une varicelle en cours de grossesse est de 1 à 7 pour 10 000 (6, 7, 44).

Le virus de la varicelle et du zona (VZV) peut être responsable de perte fœtale ou d'une embryo-fœtopathie appelée syndrome de varicelle fœtale. La fréquence des avortements et des morts in utero est de 3 à 6 % (30, 57) mais les cas réellement documentés de morts fœtales liées à la varicelle sont rares (21). La fréquence du syndrome de VC est diversement appréciée selon les auteurs. Cette incidence varie entre 0 et 9 % (10).

*Tableau III*  
*Fréquence des atteintes congénitales*  
*dues au virus de la varicelle et du zona*

Auteur	% de VC en cas de varicelle maternelle au cours du 1 <sup>er</sup> trimestre	% de VC en cas de varicelle maternelle au cours du 2 <sup>e</sup> trimestre (< 20 SA)
Siegel et al. (1973)	2/27 (7,4 %)	0/32
Paryani (1986)	1/11 (9,1 %)	0/27
Bal. ducci (1992)	0/35	
Pastuszak (1994)	1/49 (2 %)	0/37
Enders et al. (1994)	2/472 (0,4 %)	7/351 (2 %)
Mouly et al. (1997)	2/75 (2,6 %)	1/19 (5,3 %)
Total	8/669 (1,2 %)	8/466 (1,7 %)

L'étude la plus importante portant sur le risque d'anomalie congénitale liée à la varicelle a été rapportée par Enders et al. (30) en 1994. Il s'agit d'une étude prospective réalisée en Allemagne et au Royaume-Uni entre 1980 et 1993, portant sur 1373 femmes qui avaient une varicelle et 366 un zona avant 36 SA. Avaient été identifiés 9 cas de varicelle congénitale, survenant chaque fois après varicelle maternelle contractée lors des 20 premières semaines de grossesse.

Les risques en fonction de l'âge d'atteinte étaient :

– < 13 SA : 0,4 % (2/472);

– 13-20 SA : 2 % (7/351);

Parmi les 366 femmes atteintes de zona, aucun enfant à la naissance ne présentait de signe clinique d'infection in utero.

Les IgM ont été retrouvés à la naissance chez 25 % des enfants présentant une infection clinique. 12 % des enfants asymptomatiques nés de mères ayant contracté une varicelle avaient des IgM à la naissance. Les sérologies étaient négatives en cas de zona maternel.

## ***2. Biologie fœtale et diagnostic prénatal***

L'étude de Mouly et al. (80), représente la première série de diagnostics prénatals par PCR sur liquide amniotique dans les varicelles entre 0 et 24 SA (107 patientes). Elle évalue à 8,4 % la contamination fœtale in utero; à 2,8 % le risque de VC et à 3,8 % le risque de zona au cours de la première année de vie. En cas de PCR négative tous les enfants avaient un devenir normal. Au cours d'une communication personnelle, V. Mirlesse (Club de médecine fœtale, 1999) rapporte les résultats de 307 cas d'infection dont 200 prospectives analysées par la même équipe. L'infection maternelle se situait entre 8 et 26 SA. La PCR était positive dans 20 cas (6,5 %).

– 6 IMG ont été réalisées dont 4 sur signes d'appel échographique (RCIU, calcifications pulmonaires ou digestives, ventriculomégalie);

– 1 mort fœtale in utero, le fœtus présentant une triploïdie;

– 13 accouchements normaux avec un enfant porteur d'un syndrome de Claude Bernard Horner, 4 enfants ayant présenté un zona dans les 3 premiers mois de vie (1,3 %).

Cinq enfants présentaient donc un syndrome de varicelle congénitale (1,6 %). Quatre avaient montré des signes échographiques in utero.

Au vu des résultats précédents, on peut estimer que le taux de contamination fœtale lors d'une contamination maternelle avant 24 SA est de l'ordre de 6 à 8 % alors que le risque de varicelle congénitale est de 1 à 2 %. La méthode la plus sensible de diagnostic de contamination fœto-maternelle est la PCR (réalisée au moins un mois après la contamination maternelle après avoir vérifié que la PCR sur sang maternel est négative). La valeur prédictive négative de la PCR vis-à-vis de l'absence de VC paraît excellente dans la série de Mouly (80) où tous les enfants pour lesquels le diagnostic prénatal était négatif étaient normaux (suivi moyen 26 mois). Cependant, la présence du génome viral n'est pas suffisante pour conclure à une VC, étant donné que des enfants pour lesquels le diagnostic prénatal était positif ne présentaient pas de VC.

D'autres outils sont donc nécessaires pour fixer le pronostic fœtal :

– la biologie fœtale (thrombopénie, érythroblastose, lymphocytose, élévation des transaminases, de la gamma-glutamyl-transférase, des IgM totales et présence de l'interféron alpha) peut fournir une confirmation d'une infection fœtale systémique. Cependant, ces prélèvements ne sont pas sans danger et ne peuvent pas prédire le degré d'atteinte fœtale ;

– l'imagerie permet de faire le bilan et le suivi évolutif des conséquences fœtales de l'infection avec certaines limites :

- les lésions fœtales sont évolutives et certaines peuvent survenir de façon tardive par l'intermédiaire d'un zona prénatal ;

- certaines lésions sont inaccessibles à l'échographie (lésions oculaires en dehors de la microphthalmie, lésions cutanées) ;

- l'échographie peut être insuffisante pour mettre en évidence certaines lésions cérébrales telles que les anomalies de la migration neuronale ou de la giration, ou une atrophie cérébrale à un stade précoce. Un complément d'étude par IRM peut alors être utile ;

- l'apparition de signes échographiques non spécifiques n'est également pas synonyme de mauvais pronostic fœtal : plusieurs travaux montrent que les enfants peuvent être normaux malgré la mise en évidence de signes tels que : épanchement pleural, ascite et hépatomégalie (135) ou calcifications hépatiques (88,104).

En cas de notion de varicelle maternelle pergravidique, il faudra donc envisager une surveillance échographique mensuelle avec une attention particulière pour le cerveau, les membres et l'œil. Une IRM cérébrale fœtale pourra également être proposée

## PROGRÈS EN DIAGNOSTIC PRÉNATAL

aux alentours de 32 SA en recherchant en particulier des anomalies de la giration, de la migration neuronale et des signes pouvant faire évoquer une atrophie cérébrale débutante.

### Résumé

*Les progrès récents en diagnostic prénatal ont permis de réaliser ou d'entrevoir dans un avenir proche une meilleure pertinence dans l'indication des prélèvements, le développement de méthodes moins ou non invasives de diagnostic prénatal, la possibilité de réalisation plus précoce de ces examens au cours de la grossesse et une amélioration de la rapidité des résultats.*

*Le dépistage le plus performant des anomalies chromosomiques associe actuellement l'âge maternel, la mesure de la clarté nucale entre 10 et 14 SA et le dosage des marqueurs sériques au cours du premier trimestre de la grossesse.*

*L'hybridation in situ fluorescente sur cellules amniotiques non cultivées permet de diagnostiquer de façon fiable en 24 heures les principales aneuploïdies mais ne permet pas d'éliminer toutes les anomalies chromosomiques.*

*Le diagnostic prénatal par analyse de l'ADN permet de réaliser le diagnostic de nombreuses anomalies génétiques. Les avantages de l'analyse de l'ADN sont l'accès aisé au matériel d'étude (liquide amniotique, trophoblaste, sang fœtal).*

*L'isolement d'érythroblastes fœtaux ou d'ADN fœtal dans le sang maternel permet des études de l'ADN par PCR et chromosomiques par hybridation in situ fluorescente. Il paraît actuellement envisageable de promouvoir une politique de dépistage incluant ce type de technique afin de diminuer le nombre de prélèvements ovulaires invasifs.*

*Le diagnostic génétique préimplantatoire est actuellement réalisé en France. Il nécessite la réalisation d'une fécondation in vitro et est réservé à un nombre limité d'indications.*

*Le diagnostic positif d'infection fœtale virale ou toxoplasmique est actuellement obtenu grâce à l'étude du liquide amniotique. Le pronostic de l'infection fœtale est évalué essentiellement par l'échographie. L'intérêt de la biologie sanguine fœtale pour évaluer le pronostic reste encore à évaluer.*

## Bibliographie

1. Aitken DA, McCaw G, Crossley JA, Berry C, Connor JM, Spencer K, Macri JN. First trimester biochemical screening for fetal chromosome abnormalities and tube neural defects. *Prenat Diagn*, 1993; 13: 681-689.
2. Al-Mufti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaides KH. Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction. *Hum Reprod*. 2000; 15: 218-21.
3. Al-Mufti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaides KH. Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Hum Reprod*, 2000 Jul; 15: 1624-1628.
4. Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, Nicolaides KH. Investigation of maternal blood enriched for fetal cells: role in screening and diagnosis of fetal trisomies. *Am J Med Genet*, 1999; 2; 85: 66-75.
5. American College of Medical Genetic. Prenatal interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): policy statement. *Am J Hum Genet*, 1993; 53: 526-527.
6. Balducci J, Rodis J, Rosengren S, Vintzileos A, Spivey G, Vosseler C. Pregnancy outcome following first trimester varicella infection. *Obstet Gynecol*, 1992; 79: 5-6.
7. Berrebi A, Assouline C, Ayoubi JM, Parant O, Icart J. Varicelle et grossesse. *Arch Pediatr*, 1998; 5: 79-83.
8. Berrebi A, Kobuch WE, Bessieres MH, Bloom MC, Rolland M, Sarramon MF, Roques C, Fournie A. Termination of pregnancy for maternal toxoplasmosis. *Lancet*, 1994; 344: 36-39.
9. Bersinger NA, Brizot ML, Johnson A, Snijders RJM, Abbott J, Shneider H, Nicolaides KH. First trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein A and pregnancy-specific  $\beta$ 1-glycoprotein in fetal trisomies. *Br J Obstet Gynaecol*, 1994; 101: 970-974
10. Birthisle K, Carrington D. Fetal varicella syndrome; a reappraisal of the literature. *Journal of infection*, 1998; 36 suppl 1: 25-29.
11. Bohmer RM, Zhen D, Bianchi DW. Differential development of fetal and adult haemoglobin profiles in colony culture: isolation of fetal nucleated red cells by two-colour fluorescence labelling. *Br J Haematol*, 1998; 103: 351-60.
12. Bonaventure J, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Maroteaux P. Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. *Am J Med Genet*, 1996 May 3; 63: 148-54.
13. Brambati B, MacIntosh MCM, Teisner B, Maguiness S, Shrimanker K, Lanzani A, Bonacchi I, Tului L, Chard T, Grudzinskas TJ. Low maternal serum level of pregnancy associated plasma protein (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal karyotype. *Br J Obstet Gynaecol*, 1993; 100: 324-326.
14. Breen CJ, Barton L, Aiveen C, Dunlop A, Glancy M, Hall K, Hegarty AM, Khokhar MT, Power M, Ryan K, Green AJ, Stallings RL. Prenatal diagnosis by use of fetal cells isolated from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1354-1355.
15. Brizot ML, Kuhn P, Bersinger NA, Snijders RJM, Nicolaides KH. First trimester maternal serum alpha-feto protein in fetal trisomies. *Br J Obstet Gynaecol*, 1995; 102: 31-34.
16. Brizot ML, Snijders RJM, Bersinger NA, Kuhn P, Nicolaides KH. Maternal serum pregnancy associated placental protein A and fetal nuchal translucency thickness for the prediction of fetal trisomies in early pregnancy. *Obstet Gynecol*, 1994; 84: 918-922.
17. Brizot ML, Snijders RJM, Butlet J, Bersinger NA, Nicolaides KH. Maternal serum hCG and fetal nuchal translucency thickness for the prediction of fetal trisomies in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 1995; 102: 127-132.
18. Brown T, Arnand A, Ritchie LD, Clewley JP, Reid TMS. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis? *Lancet* 1984; 2: 1033-1034.

19. Cayol V, Khellil N, Portnoi MF, Milliez J. Identification des cellules fœtales dans le sang maternel. *Réalités en Gynécologie-Obstétrique*, 2000; 49: 15-22.
20. Cazenave J, Forestier F, Bessieres MH, Broussin B, Begueret J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn* 1992; 12: 119-127.
21. Connan L, Ayoubi J, Icart J, Halasz A, Thene M, Berrebi A. Intrauterine fetal death following maternal varicella infection (a case report). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 68: 205-207.
22. Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlosky M, Thulliez P, Aufrant C, Valenti D, Cox WL. Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med*, 1988; 318: 271-275.
23. DeBiasio P, Siccardi M, Volpe H, Falnuralo L, Santi F, Canini S. First trimester screening for Down syndrome using nuchal translucency measurement with free b-HCG and PAPP-A between 10 and 13 weeks of pregnancy. The combined test. *Prenat Diagn*, 1999; 19: 360-363.
24. De Graaf IM, Pajkr E, Bilardo CM, Leschot NJ, Cuckle HS, VanLith JM. Early pregnancy screening for fetal aneuploidy with serum markers and nuchal translucency. *Prenat Diagn*, 1999; 19: 458-462.
25. De la Cruz E, Shilfrin H, Elias S, Simpson KL, Jackson L, Klinger KW, Bianchi DW, Kaplan SH, Evans M, Holzgreve W, Ganshirt D. Prenatal diagnosis by use of fetal cells isolated from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol*, 1995; 173: 1354-1355.
26. Delisle MF, Wilson RD. First trimester prenatal diagnosis: amniocentesis. *Seminar in perinatology*, 1999; 23: 414-423.
27. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Eppelen JT. False négative finding in rapid interphase FISH analysis of uncultured amniotic cells. *Prenat Diagn* 1999; 19: 892-893.
28. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Eppelen JT. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of > 3,000 cases. *Fetal Diagn Ther*. 1999 Jul-Aug; 14: 193-7.
29. Elias S, Price J, Dockter et al. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet*, 1992; 340: 1033.
30. Enders G, Miller E, Craddock-Watson J, Bolley I, Ridehalgh M. Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: prospective study of 1739 cases. *Lancet*, 1994; 343: 1548-1951.
31. Engel E. Uniparental disomy: related syndromes and implications for prenatal diagnosis. *Eur J Hum Genet*, 1998; 6 suppl 1: 29-30.
32. Engel E. Uniparental disomies in unselected populations. *Am J of Hum Genet*, 1998; 63: 962-966.
33. Engel E, Delozier-Blancher DC. Uniparental disomy and imprinting: probable effect in man and strategies for their detection. *Prenat diagn*, 1991; 40: 432-439.
34. Evans MI, Henry GP, Miller WA, Bui Th, Snijders RJ, Wapner RJ, Miny P, Johnson MP, Peakman D, Nicolaides KH, Holzgreve W, Ebrahim SAD, Babu R, Jackson L. International collaborative assessment of 146 000 prenatal karyotypes: expected limitations in only chromosome specific probes and fluorescent in situ hybridization are used. *Human Reprod* 1999; 14: 1213-1216.
35. Farra C, Guidicelli B, Pelissier MC, Philip N, Piquet C. Fetoplacental chromosomal discrepancy. *Prenat Diagn*, 2000; 20: 190-193.
36. Forestier F, Hohlfeld P, Sole Y, Daffos F. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: extended experience. *Prenat Diagn* 1998; 18: 407-409.
37. Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum PA, Hayde M, Naessens A. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 843-847.
38. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, Jenum PA, Hedman K, Naessens A. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol*, 1999; 180: 410-415.
39. Frydman R. L'œuf humain: diagnostic

- pré-implantatoire et recherche. Ref Gynécol Obstet 2000; 7: 14-16.
40. Ganshirt D, Garritsen H, Miny P, Holzgreve W. Fetal cells in maternal circulation throughout gestation. *Lancet*. 1994; 343: 1038-9.
41. Gay NJ, Hesketh LM, Cohen BJ, Rush M, Bates C, Morgan-Capner P, Miller E. Age specific antibody prevalence to parvovirus B19: how may women be infected in pregnancy? *Commun Dis Rep CDR Rev* 1994; 4: R104-R107.
42. Geraedt J, Handsyde A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Thornhill A, Vanderfaullie A, Viville S. ESHRE Preimplantation genetic Diagnosis (PGD). Consortium: preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum reprod*; 14: 3138-3148.
43. Goodburn SF, Yates JRW, Raggatt PR et al. Second trimester maternal serum screening using alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotrophin, and unconjugated oestriol: experience of a regional programme. *Prenat Diagn*, 1994; 14: 391
44. Grose C, Tani O. Pathogenesis of congenital infection with three diverse viruses: varicella-zona virus, human parvovirus and human immunodeficiency virus. *Semin Perinatol* 1989; 13: 278-293.
45. Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, Abrams I, Pasternack MS, Hoff R, Heaton RB et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional *Toxoplasma* Working Group. *N Engl J Med*. 1994; 330: 1858-63.
46. Hacia JG, Collins FS. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *J Med Genet*, 1999; 36: 730-736.
47. Haddow JE, Palomaki GE, Knight GI et al. Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers. *N Engl J Med*, 1992; 327: 588-593.
48. Hall SM, Cohen BJ, Mortimer PP et al. Prospective study of human parvovirus infection in pregnancy. *Br Med J*, 1990; 300: 1166-1170.
49. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Wiston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344: 768-770.
50. Hockstein S, Chen PX, Thangavelu M, Pergament E. Factors associated with maternal cell contamination in amniocentesis samples as evaluated by fluorescence in situ hybridization. *Obstet Gynecol*, 1998; 92: 551-556.
51. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase chain reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994; 331: 695-699.
52. Holzgreve W, Garritsen HS, Ganshirt-Ahlert D. fetal cells in the maternal circulation. *J reprod Med Obstet Gynecol*, 1992; 37: 410 + 418.
53. Hurley PA, Ward RHT, Teisner B, Iles RK, Lucas M, Grudzinkas JG. Serum PAPP-A measurements in first trimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn*, 1993; 13: 903-908.
54. Jacobs PA, Melville M, Ratcliffe S, Keay AJ, Syme J. A cytogenetic survey of 11680 newborn infants. *Ann Hum Gen*, 1974; 37: 359-376.
55. Jacquemard F. Peut on établir le pronostic des infections congénitales à CMV? *Médecine fœtale et échographie en gynécologie*. 1998; 35: 19-22.
56. Johnson JM, Wilson RD, Singer J et al. Technical factors in early amniocentesis predict adverse outcome. Results of the Canadian early (EA) versus Mid-trimester (MA) Amniocentesis trial. *Prenat Diagn* 1999; 19: 732-738.
57. Jones KL, Johnson KA, Chambers CD. Offsprings of women infected with varicella during pregnancy: a prospective study. *Teratology*, 1994; 49: 29-32.
58. Jordan JA. Identification of human parvovirus B19 infection in idiopathic nonimmune hydrops fetalis. *Am J Obstet Gynecol*, 1996, Jan; 174: 37-42.
59. Kalousek DK, Langlois S, Robinson W, Telenius A, Barret IJ, Howard-peebles PN, Wilkson RD. Trisomy 7 CVS mosaicism: pregnancy outcome, placental and EDNA analysis in 14 cases. *Am J Med Genet*, 1996; 65: 348-352.
60. Kalousek DK, Vekemans M. Confined

placental mosaicism. Invited review. *J Med Genet*, 1996; 33: 529-533.

61. Kan YW, Golbus MS, Dozy AM., Prenatal diagnosis of a-thalassemia: clinical application of molecular hybridization. *N Engl J Med*, 1976; 295: 1165-1167.

62. Knott PD, Welplyg AC, Anderson MJ. Serologically proved intrauterine infection with parvovirus? *Br Med J* 1984; 289: 1660

63. Koppe JG, Loewer-Sieger DH, de Roever\_Bonnet H. Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1986; 101: 254-255.

64. Lapiere JM, Cacheux V, Luton D, Collot N, Oury JF, Aurias A, Tachjian G. Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. *Prenat Diagn* 2000; 20: 123-131.

65. Ledbetter D, Zachary J, Simpson J, Globus M, Pergament E, Jackson L, Mahoney R, Desnick R, Schulman K, Copeland K, Verlinsky Y, Yang-Feng T, Shonberg A, Babu A, Tarapel A. Cytogenetics results from the US collaborative study on CVS. *Prenat Diagn*, 1992; 12: 317-345.

66. Leperq J. Diagnostic prénatal par analyse de l'ADN. Mises à jour en gynécologie obstétrique. Ed Vigot, Paris, 1991, pp. 365-400.

67. Leschot NJ. Specific approaches to fetal cells isolation from maternal blood. *Early Human development*, 1996; 47 Suppl: S69-S72.

68. Lestou VS, Kaloused DK. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 1998; Ed 79: F223-F226

69. Levy-Mozziconacci A, Piquet C, Heurtevin PC, Philip N. Prenatal diagnosis of 22q11 microdeletion. *Prenat Diagn* 1997; 20: 1-6.

70. Levy-Mozziconacci A, Piquet C, Scheiner C, Adrai J, Potier A, Pelissier MC, Philip N. i (18q) in amniotic and fetal cells with a normal karyotype in direct chorionic villus sampling cytogenetics and pathology. *Prant Diagn* 1996; 16: 1156-1159.

71. Lewin P, Kleifenger P, Bazin A, Mossafa H, Spiro-Tapia S. Defining the efficiency of fluorescent in situ hybridization on

uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 17 407 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* 2000; 20: 1-6.

72. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1734-8

73. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 768-75.

74. Lo YM, Wainscot JS, Gilmer MD et al. Prenatal sex determining by DNA amplification from maternal blood. *Lancet*, 1989; 2: 1363-1365.

75. Lynch, Daffos F, Emanuel D, Giovagranti Y, Meisel R, Foresytier F, Cathomas G, Berkowitz RL. Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol*, 1991; 165: 714-718.

76. Macintosh MC, Iles R, Teisner B, Sharma V, Chard T, Grdzinskas JG. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A, markers for fetal Down syndrome at 8-14 weeks. *Prenat Diagn*, 1994; 14: 203-208.

77. Macri JN, Kasuuri RV, Krantz DA, Cook EJ, Moore ND, Young JA, Romero K, Larsen JW. 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.

78. Markenson GR, Yancey MK. Parvovirus infection in pregnancy. *Semin Perinatol*, 1998, 22: 309-317.

79. Marret H, De Gea S, Goudeau A, Pierre F. Rubéole et grossesse. *Encycl Med Chir, (Elsevier Paris), Gynécologie/Obstétrique*, 5-039-10, 1996, 6p.

80. Mouly F, Mirlesse V, Meritet J, Rozenberg F, Poissonnier M, Lebon P, Daffos F. Prenatal diagnosis of fetal varicella zoster virus infection with polymerase chain reaction of amniotic fluid in 107 cases. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 894-898.

81. Muller F, Cuckle H, Teisner B, Grudzinkas JG. Serum PAPP-A levels are depressed in women with fetal Down

- Syndrome in early pregnancy. *Prenat Diagn*, 1993; 13: 633-636.
82. Miller E, Fairley CK, Cohen BJ, Seng C. Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1998 Feb; 105: 174-178.
83. Mirlesse V, Magny J-F, Solé Y, Jacquemard F, Forestier F, Daffos F. Infections à VZV. Formes de la femme enceinte et du nouveau-né. *Méd Mal Infect*, 1998; 28, Spécial: 782-790
84. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *Br Med J*, 1992; 304: 867-869.
85. Nicolaides KH, Brizot ML, Patel F, Snijders R. Comparison of chorion villus sampling and early amniocentesis for karyotyping in 1,492 singleton pregnancies. *Fetal Diagn Ther*, 1996; 11: 9-15.
86. Nicolaides KH, Brizot M, Snijders RJM. Fetal nuchal translucency thickness: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 1994; 101: 782-786.
87. Ozturk M, Milunski A, Brambati B, Schs ES, Miller S, Wands JR. Abnormal maternal serum levels of human chorionic gonadotropin free subunits in triomy 18. *Am J Med Gent*, 1990; 36: 480-483.
88. Parnet-Mathieu F, Rouillac C, Puillandre P, Brossard Y. Génotypage RhD fœtal dans le plasma des femmes enceintes Rh négatif (étude prédiagnostique de 182 cas). Coommunication Xxè congrès de la SFTS. 27-29 Juin 2000, Paris.
89. Paryani S, Arvin A. Intrauterine infection with varicella zoster virus after maternal varicella. *N Engl J Med* 1986; 314: 1542-1546.
90. Pastuzak A, Levy M, Schick B, Zuber C, Feldkamp M, Gladstone J, Bar-Levy F, Jackson E, Donnenfeld A, Meschino W, Koren G. Outcome after maternal varicella infection in the first 20 weeks of pregnancy. *New Engl J Med*, 1994; 330: 901-905.
91. Pergament E, Chen PX, Thangavelu M, Fiddler M. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20: 215-220.
92. Peters, M, Nicolaides KH. Cordocente-  
sis for the diagnosis and the treatment of human fetal parvovirus infection. *Obstet Gynecol*, 1990; 75: 501-504.
93. Philip J, Bryndorf T, Christensen B. Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Prenat Diagn* 1994; 14: 1203-1215.
94. Phillips OP, Elias S, Shulman LP, Andersen RN, Morgan CD, Simpson JL. Maternal serum screening for fetal Down's syndrome in women less than 35 years of age using alpha-fœtoprotein, hCG, and unconjugated oestriol: a prospective 2-year study. *Obstet Gynecol*, 1992; 80: 353-358.
95. Pons J, Rozemberg F, Imbert M, Lebon P, Olivennes F, Lelaidier C, Strub N, Vial M, Frydman R. Prenatal diagnosis of second trimester congenital varicella syndrome. *Prenat Diagn* 1992; 11: 975-976.
96. Pretorius D, Hayward I, Jones K, Stamm E. Sonographic evaluation of pregnancies with maternal varicella infection. *J U Med* 1992; 11: 459-463.
97. Pryde PG, Nugent CE, Pridjan G, barr M, Faix RG. Spontaneous resolution of nonimmune hydrops fetalis secondary to human parvovirus B19 infection. *Obstet Gynecol*, 1992; 79: 859-861.
98. Roman S, Wallon M, Franck J, Thulliez J, Peyron F, Dumon H. Performances of prenatal diagnosis on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstetrics and Gynecology*, 2000, in press.
99. Roper EC, Konje JC, DeChazal RC, Duckett DP, Oppenheimer C, Taylor DJ. Genetic amniocentesis: gestation specific pregnancy outcome and comparison of outcome following early and traditional amniocentesis. *Prenat diagn*, 1999; 19: 803-807.
100. Sahakian V, Weiner CP, Naides SJ, Williamson RA, Scharosch LL. Intrauterine transfusion treatment of nonimmune hydrops fetalis secondary to human parvovirus B19 infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1090-1.
101. Saltvedt S, Almstrom H. Fetal loss after second trimester amniocentesis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78: 10-14.
102. Schild RL, Bald R, Plath H, Eis-Hübinger AM, Enders G, Hansmann M. Intrauterine management of fetal parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet*

Gynecol, 1999; 13: 161-166.

103. Siegel M. Congenital malformations following chicken-pox, measles, mumps and hepatitis: results of a cohort study. *JAMA* 1973; 226: 1521-1524.

104. Siffroi JP, Le Bourhis C. Le dépistage des anomalies chromosomiques fœtales par hybridation in situ fluorescente (FISH) sur cellules amniotiques non cultivées. *La revue du Praticien Gynécologie et Obstétrique*. 2000; 41: 34-37.

105. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 1994; 1229-1242.

106. Snijders RJM, Johnson S, Sebire NJ, Noble PL, Nicolaides KH. First-trimester ultrasound screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1996; 7: 216-226.

107. Snijders RJM, Noble PL, Sebire NJ, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *The Lancet* 1998; 352: 343-346.

108. Spencer K, Souter V, Tul N, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free b-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1999; 13: 231-237

109. Stranc LC, Evans JA, Hamerton JL. Chorionic villus sampling and amniocentesis for prenatal diagnosis. *Lancet* 1997; 349: 711-714.

110. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn*. 1995; 15 (1):74-7.

111. Tharapel AT, Jaswanay VL, Dockter ME et al. failure to detect fetal metaphase in lymphocyte flow sorted by maternal-fetal HLA differences. *Fetal Diagn Ther*, 1993; 8: 85-101.

112. The Canadian early and mid-trimester amniocentesis trial (CEMAT) group. Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *Lancet*, 1998; 351: 241-247.

113. Thein ATA, Abdel-Fattah SA, Kyle PM,

Soothill PW. An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20: 49-54.

114. Thiliganathan B, Sairam S, Michailidis G, Wathen NC. First trimester nuchal translucency: effective routine screening for Down's syndrome. *Br J Radiol*, 1999; 72: 946-948.

115. Thoulon JM. Diagnostic prénatal. Gestes de prélèvements. Dépistage des aneuploïdies et de la trisomie 21. Valeurs et performances de l'échographie. techniques de traitement fœtal. *Encycl Med Chir (Editions Scientifiques et médicales, Elsevier SAS, Paris), Gynécologie/Obstétrique, 5000-A-06,2000,5p.*

116. Torok T.J. Human parvovirus B19 infection in pregnancy. The pediatric infectious disease journal 1990,9,10: 772-777.

117. Valerio D, Altieri V, Antonucci FR, Aiello R. Characterization of fetal haematopoietic progenitors circulating in maternal blood of seven aneuploid pregnancies. *Prenat Diagn*. 1997; 17: 1159-69.

118. Van Lierde M, Lamy M. Cytomégalovirus et grossesse. *Encycl Med Chir (Elsevier Paris), Gynécologie/Obstétrique, 5-039-D-20, 1995, 6p.*

119. Van Steirteghem A, Lenaers I. Le diagnostic pré-implantatoire. Mises à jour en gynécologie et obstétrique. *Vigot, Paris.1999.p 287-295.*

120. Vial-Courmont M, Guérot-Boithias C, Audibert F, Grangeot-Keros L. Infection materno-fœtale à cytomégalovirus. *Medicine Thérapeutique Pédiatrie*, 1998; 6: 489-498.

121. Ville Y. The mégalo virus. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1998; 12: 151-153.

122. Vville S. Le diagnostic pré-implantatoire en France. *Genesis*, 2000,57: 15-17.

123. Vincent Y, Bernard JP, Laroussinie MP, Lafay Pillet MC, Taurelle R. Varielle et grossesse. *Rev. Fr. Gynécol. Obstet*, 1992; 87,10: 490-492.

124. Wald NJ, Kennard A, Densem JW, Cuckle HS, Chard T, Butler L. Antenatal maternal serum screening for Down's syndrome: results of a demonstration project. *Br Med J*, 1992; 305: 291-394.

125. Wald N, Stone R, Cuckle HS, Grudzinskas JG, Barkai G, Brambati B, Teisner B, Fuhrmann W. First trimester

concentrations of pregnancy associated plasma protein A and placental protein 14 in Down's syndrome. *Br Med J.* 1992; 305, 28.

126. Watt-Morse ML, Laifer SA, Hill LM. The natural history of fetal cytomegalovirus infection as assessed by serial ultrasound and fetal blood sampling: a case report. *Prenat Diagn*, 1995; 15: 567-570.

127. Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital toxoplasmosis infection. *Pediatrics* 1980; 66: 767-774.

128. Winsor EJ, Dyack S, Wood-Burgess

EM, Ryan G. Risk of false-positive prenatal diagnosis using interphase FISH testing: hybridization of alpha-satellite X probe to chromosome 19. *Prenat Diagn.* 1999 Sep; 19 (9):832-6.

129. Winsor EJ, Silver ME, Theve R, Wright M, Ward BE. Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1996; 16: 49-54.

130. Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2,3,7,8,9,16 and 22: their incidence, likely origins and mechanism for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn*, 1996; 16: 511-524.