

Aspects médicaux des diagnostics avant l'implantation

A Boué

INSERM, U73, Château de Longchamp, 75016 Paris, France

(28^e Réunion de la Société Française pour l'Étude de la Fertilité; Paris, 19-21 octobre 1989)

Résumé — Avec les techniques actuellement disponibles il n'est pas possible d'envisager des analyses cytogénétiques et des analyses enzymatiques sur les 1 ou 2 cellules qu'il serait éventuellement possible de prélever sur un embryon humain avant sa réimplantation. Les techniques récentes d'amplification de l'ADN pourraient permettre certaines analyses dans quelques indications (diagnostic de sexe ou diagnostic de quelques maladies monogéniques), leur fiabilité demande à être contrôlée et on ignore les conséquences d'une micromanipulation de l'embryon. Il reste à envisager l'application médicale qui impose à un couple fécond la fécondation *in vitro* et son faible taux de succès, alors que pour ces maladies il existe des techniques de diagnostic prénatal précoce qui ont démontré leur fiabilité.

biopsie de l'embryon / diagnostic prénatal

Summary — **Medical aspects of preimplantation diagnosis.** *With the currently available techniques, it is not possible to perform cytogenetic and enzymatic analyses on 1 or 2 cells collected from a human embryo prior to its reimplantation. The recent techniques of polymerase chain reaction may allow DNA analyses in some cases: sexing or diagnosis of monogenic diseases. The reliability of these techniques and the absence of adverse effects due to embryo micromanipulation have to be demonstrated. The practical medical application of preimplantation diagnosis requires in vitro fertilization in a fertile couple and its low rate of success has to be compared to the reliability of the early prenatal diagnosis on chorionic villus samples.*

embryo biopsy / prenatal diagnosis

INTRODUCTION

Devant les possibilités ouvertes par les techniques de fécondation et de culture des embryons *in vitro* avant la réimplantation d'une part et d'autre part par les techniques d'analyse génétique réalisables sur quelques cellules prélevées sur cet embryon, voire une, le médecin doit se poser quelques questions : 1) comment réaliser en pratique ces diagnostics avant l'implantation ? 2) quels seraient les éventuels effets pervers ? 3) quel serait l'intérêt potentiel de ces techniques en comparaison de

ce qui est actuellement réalisé grâce au diagnostic prénatal par amniocentèse ou par prélèvement de villosités choriales ?

Les diagnostics réalisables sur des cellules du conceptus concernent trois domaines.

L'analyse cytogénétique

La technique classique d'établissement du caryotype fœtal à partir de l'analyse des chromosomes en métaphase présente le grand avantage de pouvoir déceler, avec

une seule analyse, tous les différents types d'anomalies chromosomiques; anomalies de nombre ou de la structure des chromosomes.

La nécessité d'avoir des métaphases, seuls moments où les chromosomes sont figurés, demande un système cellulaire en prolifération active pour que statistiquement au moment de la fixation on dispose d'un certain nombre de métaphases analysables (sur un cycle de division de la cellule durant environ 17 h, la métaphase analysable dure 30 min; des poisons mitotiques peuvent bloquer les cellules en métaphase augmentant leur pourcentage).

Dans le cas de l'embryon *in vitro*, il faudrait donc avoir recours à des cultures *in vitro* de la (ou des) cellule(s) prélevée(s). Ces techniques n'existent pas encore et si elles devenaient réalisables elles comporteraient un délai de cultures de 10 à 15 j (lié au rythme biologique de la division cellulaire).

En admettant ces conditions remplies, on devra se demander si le caryotype mis en évidence est bien représentatif du caryotype de l'embryon. L'expérience acquise ces dernières années avec les diagnostics chromosomiques faits en direct sur des prélèvements de villosités chorales soulève un problème important. En effet on observe dans environ 2% des cas une discordance entre le caryotype mis en évidence en direct dans les cellules de la couche trophoblastique et le caryotype de l'embryon lui-même; ceci conduisant à des résultats faussement positifs (une anomalie est présente dans le trophoblaste alors que l'embryon a un caryotype normal) ou faussement négatif (l'embryon a une anomalie chromosomique alors que le trophoblaste a un caryotype normal).

L'étude des premiers stades du développement de l'œuf fécondé (Grane et Cheun, 1988) montre que cytotrophoblaste et embryon sont issus de 2 lignées cellulaires.

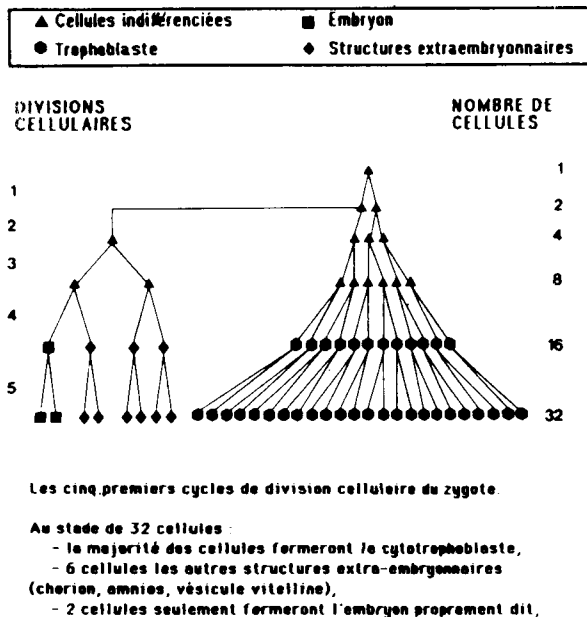


Fig 1. Le cytotrophoblaste.

lares qui se sont séparées très précocément, dont l'une se divise très activement : le cytotrophoblaste (la figure 1 illustre cette évolution).

On doit donc toujours se poser la question : dans quelle mesure la cellule prélevée sur un zygote avant l'implantation est représentative du futur embryon ?

Le diagnostic des maladies monogéniques réalisé par l'analyse du produit de l'expression du gène

Dans l'abord diagnostique par l'analyse de l'expression du gène (soit déficit complet de la synthèse d'une protéine : facteur de coagulation, d'une enzyme; maladies du métabolisme, soit production d'une protéine anormale; hémoglobinopathies), il faut savoir si la protéine s'exprime dans le tissu prélevé.

Les études sur les cellules amniotiques et sur les villosités choriales ont permis de bien sélectionner les anomalies qui sont décelables sur ces tissus (Poenu, 1989).

Malgré les progrès dans la miniaturisation des techniques, il est improbable qu'elles soient applicables en direct sur une ou quelques cellules de l'embryon; il faudrait donc avoir recours à des cultures. Il faudra alors se poser la question de l'expression de la protéine recherchée dans ce système cellulaire.

Les possibilités de l'analyse au niveau du gène par biologie moléculaire

Ce sont les méthodes d'amplification de l'ADN (*polymerase chain reaction*, PCR) qui rendent possible l'étude à partir de l'ADN d'une seule cellule. On doit se souvenir que l'amplification ne peut concerner que des segments bien définis de l'ADN,

elle est donc extrêmement spécifique et par là même limitée (Li *et al*, 1988).

Quelles pourraient être les applications de la biologie moléculaire ? 1) le diagnostic de sexe grâce à des sondes moléculaires spécifiques du chromosome Y (Handyside *et al*, 1989), qui est une technique qualitative, le sexe étant déterminé par la présence ou l'absence de l'ADN du chromosome Y; 2) le diagnostic de maladies monogéniques. L'exemple idéal est la drépanocytose puisque la même mutation est responsable de toutes les drépanocytoses, on peut donc amplifier le segment d'ADN où se situe la mutation et ainsi faire le diagnostic de l'atteinte ou de la normalité de l'embryon.

Pour les autres maladies monogéniques il faudra dans chaque cas faire une étude familiale préalable pour : 1) soit définir la (ou les) mutation(s) dans la famille à étudier : par exemple dans la β -thalassémie, on connaît 60 mutations, et les 2 parents peuvent avoir chacun une mutation différente; 2) soit préciser les marqueurs informatifs voisins du gène qui pourraient être utilisés et étudier la ségrégation des haplotypes associés à la maladie dans cette famille.

La mucoviscidose représente un exemple possible grâce au déséquilibre de liaison qui est observé dans nos populations avec une sonde moléculaire : KM-19 pour laquelle la technique PCR est applicable et tout récemment grâce à l'identification du gène et à la mise en évidence d'une mutation (Δ F 508) présente dans 70% des chromosomes porteurs du gène de la maladie (Kerem *et al*, 1989).

Le diagnostic d'anomalies chromosomiques est-il possible par biologie moléculaire ? On dispose effectivement de sondes moléculaires spécifiques d'un chromosome et qui, bien localisées, permettent d'identifier une région précise du chromo-

some. On peut donc envisager d'amplifier un fragment d'ADN d'un chromosome, le chromosome 21 par exemple.

Mais les techniques de biologie moléculaire sont surtout des techniques qualitatives (présence ou absence d'un gène), donc d'un chromosome (c'est le cas du chromosome Y pour le diagnostic de sexe), mais elles se prêtent mal à une analyse quantitative fiable et rigoureuse. Les diagnostics les plus fréquents en cytogénétique sont des diagnostics d'anomalies de nombre. Il faudrait donc pouvoir distinguer la présence de 3 copies d'un ADN au lieu de 2 copies et ceci avec une technique régulièrement fiable, ce qui est actuellement exclu.

Il a été proposé de faire une hybridation moléculaire, *in situ*, sur des cellules en interphase, le chromosome étant ainsi marqué grâce à une sonde moléculaire spécifique (fluorescente par exemple). Une analyse au microscope permettrait de préciser si le chromosome ainsi identifié existe en 2 ou 3 exemplaires (Julien *et al*, 1986).

On se heurte en pratique aux problèmes liés à la qualité de la technique et à la qualité de la lecture. L'expérience du marquage du chromosome Y avec des colorants fluorescents a montré les difficultés de ces techniques pour garantir une grande fiabilité lors de leur application.

Quelles seraient les conditions d'une application pratique ?

Sur le plan de la demande : l'expérience des dernières années a montré que le dépistage des anomalies chromosomiques est, de loin, la demande la plus importante de diagnostics prénatals. Cette année, ce sont environ 20 000 diagnostics cytogénétiques qui seront pratiqués en France;

viennent ensuite les diagnostics de maladies monogéniques par analyse de l'expression du gène (quelques centaines) et les diagnostics par biologie moléculaire également quelques centaines en tout.

Sur le plan de la méthode de diagnostic génétique : les impératifs d'une application d'une technique de diagnostic ne sont pas les mêmes que ceux de la recherche. On ne peut envisager que des techniques parfaitement fiables.

Compte tenu des demandes potentielles de diagnostics et des impératifs techniques, on ne pourrait théoriquement envisager que : 1) le diagnostic de sexe dans quelques maladies liées au sexe sans diagnostic prénatal; 2) le diagnostic de quelques maladies monogéniques celles en particulier où il n'existe qu'une seule mutation (la drépanocytose par exemple) et où les techniques d'amplification de l'ADN sont possibles (mucoviscidose).

Sur le plan de l'acte médical : dans le cas d'un diagnostic sur l'embryon *in vitro*, il faudra une fécondation *in vitro* et une réimplantation des embryons reconnus normaux, ce n'est que dans 15% des cas que la grossesse ira à terme bien que l'œuf implanté soit normal (ce sont les chiffres favorables de succès de la fivete) d'où la nécessité d'analyser un grand nombre d'embryons qui seront conservés congelés en vue d'implantations ultérieures en cas d'échec ou en cas de désir d'un second enfant.

Avec le diagnostic prénatal *in utero*, tel qu'il est réalisé actuellement, dans le cas, de loin le plus fréquent, de maladies récessives autosomiques ou liées au chromosome X, 75% des fœtus sont normaux, les grossesses vont à terme avec naissance d'un enfant normal.

On remplace donc les traumatismes physiques et psychologiques du diagnostic

prénatal et de l'interruption de grossesse, par les traumatismes physiques et psychologiques de la fivete, ceci chez un couple fécond qui supportera mal des échecs réétés.

Enfin on ignore actuellement les effets pervers que pourraient avoir le prélèvement de quelques cellules sur le développement de l'embryon.

Il n'est pas inutile de mentionner le coût d'un diagnostic sur l'embryon *in vitro* qui cumulera le coût du diagnostic génétique (parfois déjà très élevé), le coût de la manipulation et la conservation de l'embryon et le coût médical de fivete, coût qu'il faut multiplier par le nombre des essais.

Enfin un dernier point ne doit pas être oublié. Dans les maladies monogéniques ou les maladies liées à l'X les couples à risque sont généralement des couples jeunes et féconds. Après le succès de la réimplantation qui ne sera pas toujours dans le cycle où les ovocytes ont été prélevés, on doit toujours se poser une question : cet embryon est-il celui qui a été réimplanté après un diagnostic de normalité ou est-il le fruit d'une conception naturelle contemporaine ?

Il faudra donc s'assurer de la qualité du fœtus *in utero* par un diagnostic prénatal. Ceci n'est pas une boutade, nous avons déjà rencontré ce problème dans les cas d'insémination artificielle avec donneur chez des couples à risque de transmettre une maladie autosomique récessive.

Dans ces conditions faut-il faire un diagnostic avant l'implantation avec tous les

effets pervers connus et inconnus de cette méthode alors qu'on dispose de techniques de diagnostic prénatal beaucoup plus simples, beaucoup plus efficaces et fiables ?

La pression vers un diagnostic avant l'implantation est poussée par un désir de prouesse technologique et peut trouver comme justification la «bonne conscience» de dire qu'on évite une interruption de la grossesse.

RÉFÉRENCES

- Grane JP, Cheun SW (1988) An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue. *Prenatal Diagn* 8, 119-130
- Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Pattinson JK, Delhanty JDA, Tuddenham EGD (1989) Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplifications. *Lancet* i, 347-349
- Julien C, Bazin A, Guyot B, Forestier F, Daffos F (1986) Rapid prenatal diagnosis of Down's syndrome with *in situ* hybridization of fluorescent DNA probes. *Lancet* ii, 863-864
- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan J, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Bruchwald M, Tsui CC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-1080
- Li H, Gyllensten UB, Cui X, Saika RK, Erlich HA, Arnheim N (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335, 414-417
- Poenaru L (1989) Maladies héréditaires du métabolisme. In: *Médecine Périnatale, Biologie Clinique du Fœtus* (Boué A, ed) Flammarion, Paris, 119-139