

LE DIAGNOSTIC PRÉIMPLANTATOIRE (DPI) DES MALADIES GÉNÉTIQUES EN FRANCE

Dr Julie STEFFANN, médecin biologiste, Hôpital Necker

Introduction

Le diagnostic préimplantatoire consiste en l'analyse génétique d'une ou deux cellules embryonnaires (blastomère), prélevées à partir d'embryons issus de fécondation in vitro (FIV), en général au troisième jour de leur développement.



Le prélèvement d'un blastomère s'effectue à partir d'un embryon âgé de 3 jours.

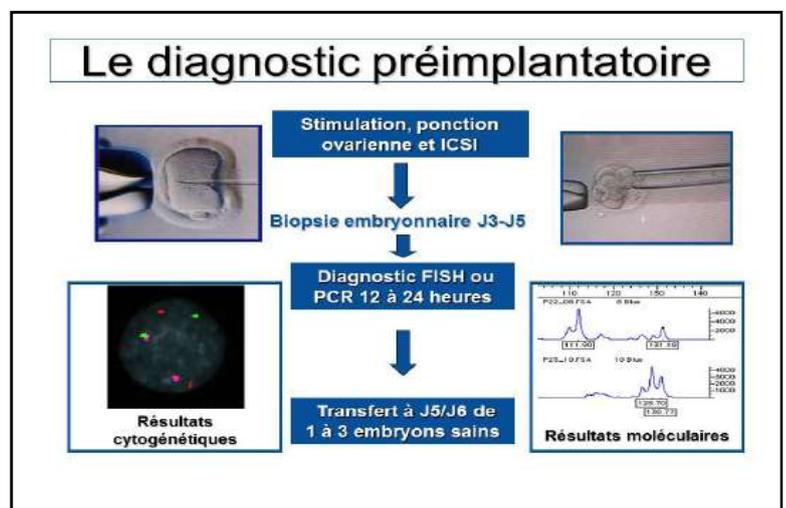
Il permet à des couples à risque élevé de transmettre une maladie génétique grave et incurable, de s'assurer du statut embryonnaire avant toute grossesse. Il évite ainsi aux couples concernés l'épreuve de l'interruption médicale de grossesse en cas de fœtus atteint.

Deux grands types d'analyse génétique peuvent être réalisées : une hybridation in situ fluorescente sur noyau interphasique (FISH) à la recherche d'une anomalie chromosomique, ou une amplification génomique (PCR) à la recherche d'une anomalie génique, selon la pathologie concernée pour le couple. C'est cette deuxième méthode qui est appliquée au diagnostic des maladies monogéniques et qui est donc en général utilisée dans le cadre des maladies avec surdité. Le statut de l'embryon (sain, atteint) est déterminé dans la journée, permettant le transfert des embryons sains dans l'utérus de la patiente au plus tard au 6^{ème} jour de leur développement.

Cette procédure reste d'une lourdeur incontestable pour des chances de succès limitées puisque moins de 20% des stimulations ovariennes débutées aboutissent à la naissance d'un enfant.

TECHNIQUE DU DIAGNOSTIC PRÉIMPLANTATOIRE.

Après stimulation hormonale, et déclenchement de l'ovulation, une ponction ovarienne est réalisée. Les ovocytes ainsi recueillis sont inséminés par l'injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI), afin d'éviter une éventuelle contamination par des spermatozoïdes qui seraient accolés à la zone pellucide. Une biopsie est réalisée en règle entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour de développement embryonnaire. Après perforation de la zone pellucide par un laser, une à deux cellules sont prélevées sous contrôle microscopique. Le diagnostic est ensuite réalisé sur la ou les deux cellules séparément, soit par des méthodes de diagnostic moléculaire (PCR, DPI génique), soit par des méthodes d'analyse chromosomique (FISH, DPI chromosomique). Le transfert des embryons sains dans l'utérus de la patiente est réalisé au plus tard au 6^{ème} jour de développement embryonnaire.



LA RÉGLEMENTATION FRANÇAISE

Le DPI s'est développé en Angleterre et a été appliqué d'abord à la sélection d'embryons féminins, dans des maladies récessives liées à l'X¹. Les progrès techniques ont ensuite permis la réalisation du premier DPI de mucoviscidose en 1992². La technique s'est implantée en France des années plus tard, probablement du fait de la crainte de dérives eugéniques. La France s'est dotée de lois encadrant rigoureusement cette activité. Ainsi, en 1994, les lois de bioéthique ont autorisé la pratique du diagnostic préimplantatoire sous certaines conditions (art L2131-4) : le couple doit avoir 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. L'anomalie ou les anomalies responsables doivent avoir été identifiées préalablement chez les parents, et le diagnostic doit se limiter à l'affection considérée. Un consentement de chacun des parents doit être obtenu.

En France, le DPI est donc strictement encadré au plan législatif, et se limite au diagnostic de maladies génétiques, dans le cadre d'un risque élevé d'atteinte embryonnaire. La loi française exclut ainsi tout « dépistage » en matière de DPI. Aujourd'hui, quatre centres sont autorisés à réaliser du diagnostic préimplantatoire en France : Paris (Necker-Béclère), Strasbourg, Montpellier et Nantes.

LES PATHOLOGIES PRISES EN CHARGE

La diversité des maladies génétiques prises en charge est en constante augmentation. Parmi les maladies monogéniques récessives, la mucoviscidose reste la première indication notamment lorsqu'elle s'associe à une agénésie des canaux déférents, car les couples ont alors, en plus du risque génétique, un problème d'infertilité. La dystrophie myotonique de Steinert est la première indication parmi les maladies autosomiques dominantes.

Parmi les 130 maladies génétiques pour lesquelles un DPI est disponible dans notre centre, 8 maladies sont associées à un risque de surdité (ostéogénèse imparfaite, syndrome de Treacher Collins et Franceschetti, cytopathies mitochondriales par mutation de l'ADN mitochondrial, syndrome d'Alport, dysostose mandibulo-faciale, syndrome oto-palato-digital et surdité profonde isolée). Le plus souvent dans ces pathologies, la surdité n'est pas au premier plan. Toutes ces pathologies confondues, 28 DPI ont été réalisés, ce qui représente une part faible de notre activité (3%).

LES COUPLES

Les couples à risque de transmettre une maladie génétique grave à leur descendance ont plusieurs possibilités afin de prévenir sa transmission. Le diagnostic prénatal est une option, mais il comporte un risque d'interruptions de grossesse à répétition. Le don de gamètes ou d'embryons, ou encore l'adoption sont également des possibilités. Le DPI constitue une alternative concrète, qui permet d'éviter la pression psychologique suscitée par le diagnostic prénatal classique³.

Les couples ayant recours au DPI ont souvent une histoire complexe, comprenant la naissance d'un enfant malade voire son décès et/ou des interruptions médicales de grossesses (25% des couples). Moins de 20% des couples qui font la demande d'un DPI ont un enfant sain vivant⁴⁻⁷.

Le DPI reste toutefois une procédure lourde, imposant le recours à une aide médicale à la procréation, pour des couples qui ne présentent souvent pas de problème de stérilité. Du fait des faibles chances de succès de la fécondation in vitro, il convient d'informer le couple dès le début des contraintes et du taux de naissance relativement faible⁸, idéalement au cours d'une consultation de génétique.

LE PARCOURS DES COUPLES

Les demandes de prise en charge par DPI sont généralement adressées par un généticien, un gynécologue ou parfois par les couples eux-mêmes. Elles sont discutées lors d'un staff pluridisciplinaire réunissant généticien, gynécologue, biologiste de la reproduction et sage-femme coordinatrice. Le but de cette réunion est d'évaluer l'éligibilité et la faisabilité du DPI pour chaque couple.

Lorsque les critères de recevabilité de l'indication génétique, et de la faisabilité génétique et gynécologique (possibilité de prise en charge par fécondation in vitro) sont remplis, les couples sont reçus en consultation pluridisciplinaire (gynécologue, généticien, sage-femme, psychiatre) afin de revoir la procédure de DPI avec le couple, de faire le point sur les examens prérequis (réserve ovarienne, spermogramme, hystérocopie...) et de programmer le début du traitement hormonal.

La stimulation hormonale débute dans les 6 mois suivant cette consultation, délai nécessaire à la mise au point technique du test génétique sur cellule unique.

LES LIMITES

La prouesse technologique d'un DPI est d'obtenir un nombre suffisant d'embryons à haut potentiel de développement dont il faut déterminer le diagnostic génétique à partir d'une seule cellule. L'absence de critères non invasifs permettant de connaître la viabilité d'un embryon contraint les équipes clinico-biologiques à obtenir un nombre élevé d'embryons de bonne morphologie.

Dans le cadre du DPI génique, en dehors des impossibilités du diagnostic (mise en évidence de duplication, analyse de fragment de grande taille), le peu de matériel biologique disponible exige de recourir à une optimisation des techniques pour obtenir le niveau de sensibilité requis. Il en résulte un

risque de contamination de la réaction par d'autres cellules ou par des fragments d'ADN préalablement amplifiés. Ces contaminations peuvent être une source d'erreur diagnostique. D'autre part, il persiste un artefact inhérent à la PCR sur cellule unique, celui du phénomène d'allèle drop-out (amplification d'un seul des deux allèles présents dans la cellule⁹). Les conséquences de ce phénomène peuvent être dramatiques, par exemple dans le cas d'une pathologie autosomique dominante où seul l'allèle sain est amplifié, conduisant à méconnaître l'allèle atteint dans la cellule, et à une erreur diagnostique.

Enfin, à côté de ces difficultés, le bref délai du diagnostic (12 à 24 heures) imposé par la nécessité du transfert rapide des embryons, nécessite le recours à des techniques d'analyse elles-mêmes rapides, et restreint le choix parmi les techniques diagnostiques utilisables.

Au total, les données les plus récentes font état d'un risque d'erreur faible, de l'ordre de 0.5% après PCR¹⁰. Ce risque d'erreur justifie de proposer un diagnostic prénatal de confirmation pour toute grossesse après DPI. Dans notre centre, les couples sont recontactés systématiquement en début de grossesse afin d'aborder le risque d'erreur résiduel du DPI, les bénéfices et les risques d'un prélèvement fœtal visant à confirmer les résultats du DPI.

Si le résultat n'est pas vérifié en anténatal, une confirmation sur un prélèvement de sang de cordon à la naissance de l'enfant est proposée. Dans notre centre, 94% des enfants nés après DPI ont bénéficié d'une vérification du diagnostic réalisé au stade préimplantatoire. Aucune discordance n'a été mise en évidence entre les résultats obtenus en période préimplantatoire et ceux obtenus lors de la vérification. La proportion de diagnostic réalisé à la naissance augmente alors que le nombre de vérification au cours de la grossesse diminue. Ceci reflète très probablement la réticence d'un grand nombre de patientes à recourir à un examen invasif une fois la grossesse obtenue après FIV et DPI.

La principale contrainte du DPI est de devoir recourir à une fécondation *in vitro* pour des couples qui sont souvent normalement fertiles. Le risque d'annulation avant la ponction ovocytaire est de près de 15% compte tenu des critères de superovulation exigés, et la probabilité de bénéficier d'un transfert d'embryon n'est que de 57%.

Actuellement, les chances d'être enceinte après transfert embryonnaire sont légèrement inférieures à celles d'une fécondation *in vitro* « classique » avec un taux d'implantation de l'ordre de 30%. Au total, les chances d'avoir un enfant sain au terme de la procédure sont d'environ 17%. Ce taux est significativement réduit chez les femmes de plus de 38 ans¹¹, ce qui nous a amené à ne plus proposer cette procédure à ce groupe de patients. Le nombre de tentative est limité à 3 dans notre centre.

Le diagnostic préimplantatoire constitue une alternative au diagnostic prénatal classique pour les couples à risque de transmettre une maladie génétique sévère. Il s'agit d'une procédure lourde ayant des chances de succès limitées, mais qui a l'avantage d'éviter aux couples d'être confrontés à la difficile décision d'interruption médicale de grossesse en cas de fœtus atteint suite à un diagnostic prénatal.

1. Jones KW, Singh L, Edwards RG. The use of probes for the Y chromosome in preimplantation embryo cells. *Hum Reprod* 1987; 2: 439-445.
2. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ et al. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine* 1992; 327: 905-909.
3. Katz MG, Fitzgerald L, Bankier A, Savulescu J, Cram DS. Issues and concerns of couples presenting for preimplantation genetic diagnosis (PGD). *Prenat Diagn* 2002; 22: 1117-22.
4. Geraedts J, Handyside A, Harper J, et al. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 1999; 14: 3138-48.
5. Geraedts J, Handyside A, Harper J, et al. European Society of Human Reproduction and Embryology Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium Steering Committee. ESHRE preimplantation genetic diagnosis (PGD) consortium: data collection II (May 2000). *Hum Reprod* 2000; 15: 2673-83.
6. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002; 17: 233-46.
7. Sermon K, Moutou C, Harper J, et al. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod* 2005; 20:19-34.
8. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 2004; 20: 35-48. Epub 2004 Nov 11.
9. Ray PF, Handyside AH.. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 213-8.
10. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod*. 2009.
11. Feyereisen E, Romana S, Kerbrat V, Steffann J, Gigarel N, Lelorc'h M, Bulet P, Ray P, Hamamah S, Chevalier N, Fanchin R, Foix-L'hélias L, Tachdjian G, Munnich A, Frydman R, Vekemans M, Frydman N. Preimplantation genetic diagnosis (PGD): results from a Parisian center. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2006;35:356-372.