

Le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) : l'expérience de l'Hôpital Erasme

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) : the Erasme Hospital experience

E. Gonzalez-Merino^{1,2}, S. Emiliani^{1,2}, B. Pichon³, J. Parma³, A.-S. Vannin¹, A. Delbaere^{1,2}, G. Vassart³, M. Abramowicz³ et Y. Englert^{1,2}

¹Clinique de Fertilité, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Erasme, ²Laboratoire de Recherche en Reproduction Humaine, Faculté de Médecine, U.L.B., ³Service de Génétique Médicale, Hôpital Erasme

RESUME

L'activité clinique de diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) à l'Hôpital Erasme a débuté en septembre 1999 pour un patient de caryotype 47,XYY. Au 31 décembre 2007, 79 cycles de DPI (45 couples) avaient été effectués, à savoir 41 pour des anomalies chromosomiques de structure (translocations robertsonienne et réciproque, inversion péricentrique, délétion), 10 pour des anomalies chromosomiques de nombre (47,XXY, 47,XYY, 45,X/46,XX), 10 pour du screening d'aneuploïdies pour fausses couches multiples ou échecs répétés de traitement par fécondation in vitro, 12 pour des maladies monogéniques récessives (mucoviscidose et drépanocytose) et 6 pour des maladies liées au chromosome X. Un total de 475 embryons ont été biopsiés afin de procéder à leur analyse génétique. Des embryons non atteints ont ainsi pu être transférés au cours de 58 cycles produisant 22 grossesses dont 15 évolutives. A ce jour, 9 enfants sont nés et 3 grossesses sont en cours. Après une courbe d'apprentissage, l'efficacité de notre protocole actuel de DPI se traduit par un taux de grossesse total par transfert de 60,0 % et un taux d'implantation de 28,6 %. Un diagnostic anténatal ou postnatal a, à chaque fois, confirmé le résultat du diagnostic génétique préimplantatoire. Nos résultats démontrent que le DPI est une technique valide pour permettre aux couples à haut risque de transmettre une anomalie génétique, d'augmenter leurs chances d'une grossesse non atteinte, mais sa complexité nécessite une information et une sélection rigoureuses des patients.

Rev Med Brux 2008 ; 29 : 527-34

ABSTRACT

The clinical activity of the preimplantation genetic diagnosis (PGD) at Erasme Hospital was carried out since September 1999 for a 47,XYY patient. Up to 31 December 2007, 79 PGD cycles were carried out (45 couples) for either chromosomal structural abnormalities (robertsonian and reciprocal translocations, pericentric inversion, deletion) (n = 41), chromosomal numerical abnormalities (47,XXY, 47,XYY, 45,X/46,XX) (n = 10), aneuploidy screening for recurrent miscarriages or multiple in vitro fertilization failures (n = 10), autosomal recessive diseases (cystic fibrosis and sickle cell anaemia) (n = 12) or X-linked disorders (n = 6). A total of 475 embryos were biopsied for genetic analysis. Unaffected embryos were transferred in 58 cycles, resulting in 22 pregnancies, including fifteen clinical pregnancies. Up to now, 9 babies were born and 3 pregnancies are still ongoing. After a learning curve, our current PGD efficiency shows a total pregnancy rate per transfer of 60.0 % and an implantation rate of 28.6 %. Each PGD result was confirmed by prenatal or postnatal diagnosis. Our data demonstrate that PGD is a valid technique to allow couples at high risk of transmitting a genetic abnormality to increase their chances of a healthy pregnancy, but considering its complexity, patients must be counselled and selected rigorously.

Rev Med Brux 2008 ; 29 : 527-34

Key words : preimplantation genetic diagnosis (PGD), IVF, pregnancy rate

INTRODUCTION

En génétique médicale, certaines grossesses considérées à risque en fonction, par exemple, des antécédents familiaux ou d'un âge maternel avancé, sont suivies par un examen anténatal tel que la biopsie de villosités choriales ou l'amniocentèse. Lorsque le couple combine stérilité et risque génétique, il est plus rationnel de substituer au diagnostic anténatal classique un diagnostic préimplantatoire afin de replacer d'emblée un embryon qui ne risque pas de conduire à la naissance d'un enfant atteint. En outre, le diagnostic anténatal classique peut véritablement épuiser émotionnellement des couples confrontés de façon répétée à des fausses couches ou à la prise de décision difficile d'une interruption de grossesse face à un fœtus sévèrement handicapé. D'autres, pour des raisons philosophiques personnelles, ne peuvent accepter l'idée d'une interruption de grossesse.

Grâce aux progrès de la génétique moléculaire et des techniques d'assistance à la procréation, il est maintenant possible de proposer à un couple, présentant un haut risque de transmettre une maladie génétique ou une anomalie chromosomique à leur descendance, de caractériser l'anomalie responsable avant l'implantation des embryons. En effet, le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI), une forme de diagnostic prénatal très précoce, permet de caractériser le statut génétique des embryons obtenus par fécondation *in vitro* (FIV) et donc de ne transférer dans l'utérus maternel que les embryons non atteints¹. Cette approche représente également une alternative au diagnostic prénatal classique pour les couples moralement ou religieusement opposés à interrompre une grossesse en cours².

Le DPI permet ainsi de sélectionner les embryons à implanter non plus uniquement selon leur morphologie (nombre de blastomères, taille régulière, peu ou pas de fragmentation) et leur capacité à se diviser *in vitro*, mais également en fonction de la présence ou l'absence d'anomalies génétiques liées à des pathologies lourdes.

A côté de cet aspect de diagnostic d'une pathologie génétique spécifique, il s'est développé, pour des couples sans anomalies de caryotype ou maladies génétiques connues, un *screening* préimplantatoire d'aneuploïdies " *de novo* ". En effet, les anomalies chromosomiques de nombre sont plus fréquentes dans les embryons de patientes plus âgées (≥ 36 ans)³⁻⁵ ainsi que chez les couples présentant des fausses couches à répétition^{6,7} ou plus de 3 échecs de FIV^{8,9}. Elles sont responsables de la diminution des chances de grossesse chez ces couples. En transférant uniquement des embryons normaux ou présentant un caryotype balancé, une réduction du taux de fausses couches spontanées de 95 % à 12,5 % a été observée¹⁰. Ce *screening* préimplantatoire consiste donc à effectuer, pour ces trois catégories de patientes à haut risque d'aneuploïdies, un dépistage génétique des 7 chromosomes impliqués dans 75 % des

aneuploïdies responsables des fausses couches (chromosomes 16 et 22)¹¹ ou des anomalies chromosomiques viables jusqu'à terme (13, 18, 21, X et Y) dans le but d'augmenter leurs chances de grossesse. En effet, ce *screening* va permettre d'écarter du transfert les embryons sans avenir car porteurs d'anomalies génétiques incompatibles avec la vie. Néanmoins, l'efficacité clinique de ce " PGD *screening* " reste contestée^{12,13}.

Depuis 1989, année de la première naissance issue d'un cycle DPI¹⁴, cette technique a été cliniquement utilisée dans un petit nombre des laboratoires de pointe de par le monde pour une variété toujours croissante d'indications tant cytogénétiques que moléculaires, comme rapporté par l'*ESHRE PGD Consortium*¹⁵.

Cet article compile les expériences et résultats du programme de diagnostic génétique préimplantatoire au sein de l'Hôpital Erasme depuis septembre 1999 jusqu'en décembre 2007.

MATERIEL ET METHODES

Le DPI standard se déroule en cinq étapes comprenant l'obtention d'un grand nombre d'ovocytes par stimulation ovarienne, leur fécondation *in vitro*, la biopsie d'une ou deux cellule(s) (blastomère) par embryon (3 jours après la FIV), le diagnostic génétique en lui-même et le transfert *in utero* du ou des embryon(s) sélectionné(s) (5 jours après la FIV). Durant l'analyse, les embryons sont maintenus en culture afin qu'ils puissent continuer à croître et à se diviser normalement. Les embryons non atteints non transférés et de bonne qualité morphologique sont cryopréservés.

Stimulation et fécondation des ovocytes

La stimulation des ovaires par traitement hormonal va permettre d'obtenir le plus grand nombre possible de follicules qui seront ponctionnés afin de récolter les ovocytes mûrs. Ceux-ci seront fécondés exclusivement par injection intracytoplasmique d'un seul spermatozoïde dans chaque ovocyte (ICSI) afin d'écarter tout risque de contamination de l'analyse génétique par des noyaux de spermatozoïdes qui seraient présents au niveau de la zone pellucide et d'éviter les embryons polyspermiques qui poseraient de sérieux problèmes lors de l'interprétation des résultats du DPI. Les détails de la stimulation ovarienne ainsi que ceux de la ponction folliculaire et de l'ICSI ont été décrits précédemment par notre équipe¹⁶.

La biopsie

L'extraction cellulaire par aspiration est pratiquée au travers d'une ouverture réalisée dans la zone pellucide des embryons. L'acide Tyrode, initialement utilisé dans notre laboratoire de FIV pour effectuer cette ouverture, a été remplacé dès 2001 par l'utilisation d'un rayon laser, une technique nettement moins risquée pour les cellules embryonnaires et pour l'embryon, qui

réduit le temps nécessaire pour effectuer l'ouverture et augmente le contrôle sur la taille de l'ouverture de la zone pellucide. Actuellement, nos taux de réussite de la biopsie sont de 100 % par embryon biopsiable et 99 % par blastomère.

Une technique de biopsie performante et la moins agressive possible envers les cellules respectant leur intégrité est indispensable non seulement pour ne pas compromettre le futur développement embryonnaire mais également pour obtenir un ADN intact et assurer ainsi des résultats d'analyse corrects. Ceci permet de diminuer significativement le risque de perdre des embryons pour le transfert par absence de résultats interprétables après analyse génétique de cellules dégradées.

Le stade embryonnaire 6-10 cellules (3 jours post-ICSI) a été choisi comme stade auquel est réalisée la biopsie des embryons. Il a été préféré à d'autres approches possibles telle la biopsie du premier et second globule polaire¹⁷ qui, elle, ne permet pas notamment l'analyse de la contribution paternelle. Une biopsie au stade blastocyste^{18,19} (5^{ème} jour post-ICSI) est également possible et bien que celle-ci permette d'obtenir un plus grand nombre de cellules à analyser (20-30) issues dans ce cas du trophoctoderme sans toucher ainsi au bouton embryonnaire, origine du futur fœtus, elle a deux inconvénients : d'une part, de laisser peu de temps pour l'analyse et d'autre part, de risquer d'analyser un trophoctoderme qui peut avoir divergé génétiquement du bouton embryonnaire, comme observé dans le cas de mosaïcisme confiné au placenta²⁰⁻²².

Lors de précédentes études réalisées au sein de notre laboratoire^{16,23}, nous avons constaté des différences de composition chromosomique entre les cellules d'un même embryon, phénomène appelé mosaïcisme chromosomique. En réalité, un grand nombre d'embryons *in vitro* sont mosaïques, constitués à la fois de cellules normales (diploïdes) et anormales²⁴. L'origine de ce mosaïcisme n'est pas encore clairement établie²⁵. Cependant, ce phénomène constitue une source éventuelle d'erreur si l'analyse lors d'un DPI n'est réalisée que sur une seule cellule par embryon. C'est la raison pour laquelle deux blastomères ont été prélevés sur les embryons présentant au minimum 7 cellules et seuls les embryons pour lesquels les deux cellules ont montré un résultat concordant sont transférés *in utero*. Dans le cas où l'embryon n'a que 6 cellules, un seul blastomère est prélevé et aucune biopsie n'est pratiquée sur un embryon de moins de 6 cellules.

De plus, il a été démontré que la biopsie au 3^{ème} jour post-ICSI de deux cellules totipotentes d'un embryon constitué d'au moins 7 cellules n'interfère pas avec son développement ultérieur. En effet, le taux de grossesse obtenu après biopsie est équivalent à celui obtenu après simple FIV^{21,26}.

L'analyse génétique

Les deux techniques d'analyse génétique couramment utilisées dans le cadre d'un DPI sont l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Après biopsie, chaque blastomère prélevé est soit lysé et son noyau fixé sur lame pour l'analyse FISH soit placé et lysé dans un microtube afin de réaliser l'analyse génétique par PCR.

Ces deux techniques ont été développées sur blastomères issus d'embryons surnuméraires donnés à la recherche par les couples en traitement FIV dans notre Hôpital, après la signature d'un consentement informé et l'approbation par le Comité d'éthique de l'Hôpital Erasme.

La FISH

Cette technique est utilisée en DPI pour le diagnostic de sexe dans le cadre de maladies liées au chromosome X (lorsque le gène n'est pas complètement caractérisé), le *screening* d'aneuploïdies et pour la recherche de translocations et d'inversions.

La FISH permet la visualisation de régions chromosomiques grâce à l'utilisation de sondes d'ADN marquées en fluorescence et qui sont complémentaires de ces *loci* chromosomiques spécifiques. Après hybridation et observation des cellules sous microscope équipé d'une lampe fluorescente, le nombre de spots observés, dont chaque couleur est caractéristique d'un seul chromosome, va permettre d'identifier le nombre des chromosomes ou des régions chromosomiques hybridés dans le noyau. Cette technique autorise ainsi l'identification d'un chromosome au stade nucléaire interphasique sans exiger de cultiver les cellules pour préparer un étalement métaphasique.

La PCR

Cette technique est utilisée pour la recherche de mutations responsables de maladies monogéniques.

La PCR permet de détecter des anomalies génétiques non plus au niveau chromosomique mais génique. Elle imite la réplication cellulaire naturelle de l'ADN et permet d'amplifier des courtes séquences d'ADN dans des proportions telles que la détection d'une mutation particulière devient possible à partir d'une seule cellule.

Au sein de notre institution, tous les couples demandeurs de DPI sont vus, dans un premier temps, à la fois en conseil génétique et en consultation FIV afin de rencontrer leur demande, de leur présenter tous les aspects théoriques et pratiques du DPI et de récolter toutes les informations qui seraient nécessaires à la mise au point d'un DPI. Ensuite, chaque dossier est discuté en réunion multidisciplinaire regroupant gynécologues, généticiens, biologistes et psychologues afin d'évaluer la faisabilité et l'indication, d'estimer si le

DPI est la meilleure option pour le couple, surtout s'il est fertile, et de mettre au point la stratégie technique.

Ainsi, entre septembre 1999 et décembre 2007, 175 demandes de DPI pour indications cytogénétiques (FISH) et 80 demandes pour maladies monogéniques (PCR) sont parvenues dans notre Clinique de Fertilité. Après étude de la faisabilité d'un DPI pour chacun des couples demandeurs, la moitié des dossiers a été acceptée pour DPI, 20 sont encore à l'étude et le restant a été rejeté ou classé sans suite.

RESULTATS

Le premier cycle clinique de DPI a été réalisé à l'Hôpital Erasme en septembre 1999 pour un couple dont l'homme présentait un caryotype 47,XXY (DPI par FISH). Le premier DPI clinique par PCR a lui été

effectué en septembre 2004 pour un couple à risque de transmettre la mucoviscidose.

61 cycles DPI ont été réalisés chez 35 couples avec indications cytogénétiques (entre 1 et 4 cycles par patient, avec une moyenne de 1,7 cycles). Il s'agit de 28 couples où l'un des membres présente un caryotype altéré et 7 couples pour *screening* d'aneuploïdies. Concernant les demandes pour maladies monogéniques, 12 cycles DPI ont été effectués pour un total de 7 couples (entre 1 et 3 cycles par patient, avec une moyenne de 1,7 cycles). De plus, 3 couples (six cycles) ont eu recours au DPI en raison d'une maladie liée au chromosome X. Le détail des cycles par indication est repris dans le tableau 1. A l'heure de ce bilan, près des deux tiers des cycles DPI réalisés concernent des couples présentant une anomalie de caryotype. Cependant, il est à noter une forte croissance, ces trois dernières années, des

demandes de DPI pour maladies géniques, notamment la mucoviscidose, les hémoglobinopathies et l'amyotrophie spinale. La nationalité des couples inclus dans notre programme DPI est indiquée dans le tableau 2. Toutes indications confondues, l'âge moyen des patientes est de 34,0 ans (26-43 ans). La répartition selon l'âge maternel est reprise dans le tableau 3.

Les données sur l'évolution des 79 cycles DPI sont présentées de manière globale dans le tableau 4 et détaillée selon les différentes indications DPI dans le tableau 5.

	Nombre de couples	Nombre de cycles	Pourcentage total de l'indication
A. Caryotype parental altéré (FISH)			
<i>Translocations</i>			
Translocations robertsoniennes			
Maternelle	4	9	
Paternelle	10	13	
Total	14	22	27,8 % (22/79)
Translocations réciproques			
Maternelle	3	7	
Paternelle	3	4	
Total	6	11	13,9 % (11/79)
Translocation robertsonienne + réciproque			
Maternelle	1	3	3,8 % (3/79)
<i>Inversion péracentrique</i>			
Paternelle	1	3	3,8 % (3/79)
<i>Délétion</i>			
Maternelle	1	2	2,5 % (2/79)
<i>Anomalies chromosomiques de nombre</i>			
XXY	2	6	7,6 % (6/79)
XXY	2	2	2,5 % (2/79)
Mosaïque 45,X/46,XX	1	2	2,5 % (2/79)
Total	5	10	12,7 % (10/79)
Total des indications pour caryotype parental altéré	28	51	64,5 % (51/79)
B. Maladies liées au chromosome X (FISH)	3	6	7,6 % (6/79)
C. Screening d'aneuploïdies (FISH)			
Fausse couches multiples (FCM)	3	6	7,6 % (6/79)
FCM + âge maternel avancé	3	3	3,8 % (3/79)
Echecs répétés de FIV	1	1	1,3 % (1/79)
Total des indications pour <i>screening</i> d'aneuploïdies	7	10	12,7 % (10/79)
D. Maladies monogéniques (PCR)			
Mucoviscidose	5	9	11,4 % (9/79)
Drépanocytose	2	3	3,8 % (3/79)
Total des indications pour maladies monogéniques	7	12	15,2 % (12/79)
Total général	45	79	

Tableau 2 : Nationalité des couples inclus dans le programme DPI.

Pays	Nombre de couples
Belgique	30
Italie	7
France	3
Allemagne	1
Luxembourg	1
Pays-Bas	1
Gabon	1
Niger	1
Total	45

Tableau 3 : Répartition des patientes selon l'âge.

	< 30 ans	30-35 ans	36-39 ans	≥ 40 ans
79 cycles	12 (15,2 %)	40 (50,6 %)	18 (22,8 %)	9 (11,4 %)

Tableau 4 : Données globales du programme DPI à l'Hôpital Erasme.

Patients	45
Cycles DPI (CD)	79
Cycles par couple	1,75
Ovocytes récoltés par cycle	13,1
Ovocytes inséminés par cycle	11,5
Embryons fécondés obtenus par cycle	8,5
Embryons biopsiés et analysés	475 (70,6 %/2PN)
Embryons biopsiés par cycle	6,0
Embryons analysés par FISH	418
Embryons analysés par PCR	57
Embryons transférables	152 (32,0 %)
Embryons anormaux	261 (54,9 %)
Embryons " sans résultat "	62 (13,1 %)
Cycles avec transfert d'embryons	58 (73,4 %/CD)
Embryons transférés	92
Grossesses	22
dont - grossesse biochimique	7
- grossesse clinique	15
parmi lesquelles :	
- fausses couches cliniques	3
- grossesse extra-utérine	1
- grossesses évolutives en cours	3
- accouchements	8
dont - naissance unique	7
- naissance gémellaire	1
bébés nés	9
Erreur de diagnostic par DPI	0

1.038 ovocytes ont été récoltés par ponction folliculaire avec une moyenne de 13,1 ovocytes par cycle et une fécondation, démontrée par deux *pronuclei* visibles dans l'embryon, a été obtenue pour 74 % des ovocytes mûrs inséminés.

Au 3^{ème} jour post-ICSI, 475 embryons ont été biopsiés et analysés par FISH ou PCR, avec un nombre d'embryons biopsiés par cycle variant de 1 à 15 (moyenne de 6 embryons).

Après analyse génétique, respectivement 152 (32,0 %), 261 (54,9 %) et 62 (13,1 %) embryons furent diagnostiqués transférables, anormaux et " sans résultat ". Les embryons sont classés " sans résultat " lorsque leurs noyaux sont dégradés ou non retrouvés après la technique, ou bien encore lorsqu'il n'y a pas d'hybridation ou d'amplification de l'ADN ou que le résultat de l'analyse est ininterprétable. Ces chiffres donnent une moyenne de 1,9 embryons transférables par cycle (entre 0 et 7 embryons). Neuf cycles (11,4 %) ne présentèrent que des embryons anormaux, dont un tiers des cycles pour fausses couches multiples (FCM) associés ou non à un âge maternel avancé et 27 % (3/11) des cycles pour translocation réciproque (tableau 5).

Un transfert d'embryons a été réalisé lors de 58 cycles (33 couples), avec une moyenne de 1,6 embryons transférés par cycle. Notons que la totalité des DPI pour maladies monogéniques et maladies liées à l'X ont eu un transfert embryonnaire ainsi que 90 % et 77 % des DPI pour anomalies chromosomiques de nombre et translocation robertsonienne, respectivement. Par contre, seuls 50 % des DPI pour *screening* d'aneuploïdies et 45 % des DPI pour translocation réciproque ont eu un transfert (tableau 5). Au total, 7 grossesses biochimiques et 15 grossesses cliniques ont été obtenues. Le nombre de grossesses par indication est repris dans le tableau 5. Parmi ces

Tableau 5 : Détails de l'évolution des cycles DPI selon l'indication.

Indications	Cycles avec biopsie et analyse	Cycles sans embryon normal	Cycles avec transfert	Grossesses
Translocation robertsonienne	22	2	17	8
Translocation réciproque	11	3	5	1
Translocation roberts. + réc.	3	0	1	0
Inversion péricentrique	3	1	2	1
Délétion	2	0	1	1
XXY	6	0	6	1
XXY	2	0	2	1
45,X/46,XX	2	0	1	0
FCM	6	2	3	0
FCM + âge maternel avancé	3	1	1	0
Echecs répétés FIV	1	0	1	1
Maladies liées à l'X	6	0	6	3
Mucoviscidose	9	0	9	3
Drépanocytose	3	0	3	2
Total	79	9	58	22

15 grossesses cliniques, trois se sont soldées par une fausse couche, une était extra-utérine et 11 ont continué à évoluer normalement (avec pour indication de DPI une translocation robertsonienne (n = 4), une translocation réciproque (n = 1), une inversion péricentrique (n = 1), une délétion chromosomique (n = 1), une maladie liée à l'X (n = 1), un portage mucoviscidose (n = 1) et un portage drépanocytose (n = 2)). A l'heure de ce bilan, de ces 11 grossesses évolutives, 8 ont été menées jusqu'à terme, dont une gémellaire, donnant naissance à 9 bébés, et 3 grossesses sont toujours en cours. Un diagnostic anténatal, proposé systématiquement aux patientes enceintes après DPI, ou un diagnostic postnatal ont, à chaque fois, confirmé le résultat du diagnostic génétique préimplantatoire. Aucune erreur de diagnostic par DPI n'est survenue dans cette série.

Un point important à souligner est que l'une des grossesses en cours concerne un couple HIV sérodiscordant où les deux membres sont porteurs de la drépanocytose et la patiente est HIV positive avec une charge virale indétectable sous HAART²⁷. Ce DPI a été réalisé dans le cadre du programme spécial de FIV que mène, depuis 1999, la Clinique de Fertilité de l'Hôpital Erasme pour les patients HIV positifs²⁸⁻³⁰.

Afin d'améliorer l'efficacité de notre protocole DPI, des améliorations techniques lui ont été apportées en 2005. La procédure de biopsie a été revue en profondeur en la rendant plus rapide et plus précise et différents milieux de biopsie ont été testés, nous permettant ainsi d'obtenir des cellules de meilleure qualité pour une analyse plus aisée tout en ne compromettant pas le futur développement de l'embryon biopsié. Ce nouveau protocole DPI s'est rapidement traduit par une augmentation significative du nombre de grossesses après DPI (figure), nous donnant des taux actuels de grossesse totale par

transfert de 60,0 % et d'implantation de 28,6 %. Notons que ces chiffres sont équivalents à ceux publiés dans le dernier rapport de l'ESHRE PGD Consortium¹⁵.

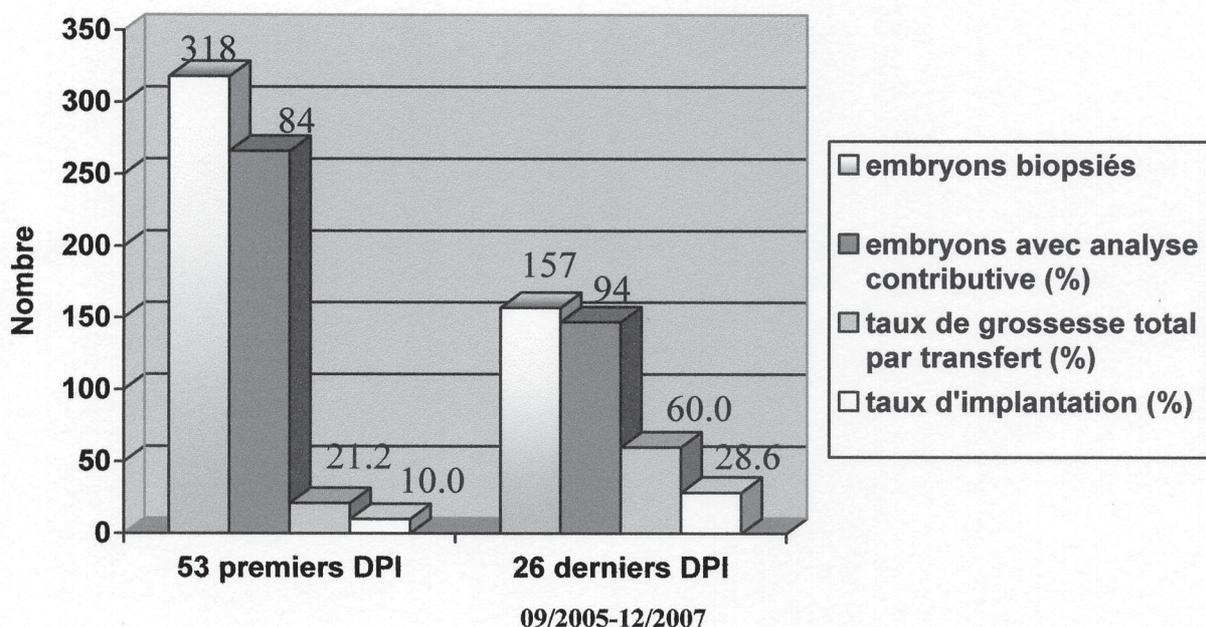
CONCLUSIONS

Introduit en médecine reproductive comme complément à la fécondation *in vitro* en cas de maladie génétique associée à la stérilité plutôt que comme une alternative au diagnostic anténatal, le DPI représente aujourd'hui une entité à part entière disponible pour la prévention tant des maladies monogéniques que des anomalies chromosomiques. L'application clinique du DPI a ouvert une nouvelle aire dans le traitement des couples infertiles et des patients porteurs d'une maladie génétique.

En regard des taux de grossesse, les résultats encourageants de notre série de DPI démontrent clairement que cette technique peut être considérée comme une alternative valide et fiable au diagnostic prénatal et qu'elle peut être pratiquée avec des taux d'implantation et de grossesse tout à fait comparables à ceux de la FIV seule. Elle est applicable à un éventail de plus en plus large de patients et de maladies génétiques. De plus, il s'agit d'une alternative intéressante dans le cas des patientes HIV positives et porteuses d'une anomalie ou maladie génétique chez qui un test prénatal invasif comporte un risque au moins théorique de transmission virale materno-fœtale. Néanmoins, l'analyse DPI étant réalisée sur une ou deux cellules maximum par embryon, elle n'exclut pas la recommandation du recours à un diagnostic prénatal de confirmation, étant donné le risque d'erreur, faible mais inhérent à une analyse pratiquée sur si peu de matériel. Aucune erreur de diagnostic n'a cependant été rencontrée dans la présente série.

La demande de recours au DPI par des couples

Figure : Evolution des résultats DPI. Gonzalez-Merino et al.



par ailleurs fertiles est clairement en augmentation dans notre expérience clinique. Or, le DPI reste une technique lourde, compliquée et éprouvante, qui nécessite une collaboration étroite entre spécialistes tant de médecine reproductive que de génétique clinique et moléculaire. Cette lourdeur technique est responsable du nombre important de demandes de DPI classées sans suite, particulièrement chez les patients fertiles qui, une fois correctement informés, décident de ne pas continuer dans la voie du DPI, lui préférant une grossesse spontanée associée à un diagnostic anténatal classique et une éventuelle interruption de grossesse. C'est pourquoi les patients référés pour DPI doivent être informés rigoureusement quant à la complexité du traitement FIV et d'un diagnostic génétique réalisé sur une seule cellule ainsi que sur les chances réelles de succès. Les taux de grossesse restent cependant clairement plus faibles pour des indications telles que les translocations réciproques, les FCM et un âge maternel avancé. A côté des demandes de DPI jugées éthiquement inacceptables comme le diagnostic de sexe pour convenance personnelle, le *screening* d'aneuploïdies représente la grande majorité des dossiers DPI refusés en commission multidisciplinaire puisque d'une efficacité clinique toujours contestée. Analyser le plus grand nombre possible d'embryons lors du DPI permet d'augmenter fortement les chances de trouver le ou les meilleur(s) embryon(s) à transférer *in utero* et donc d'augmenter les chances de grossesse. Lorsque les patients sont sélectionnés de manière appropriée, les taux de grossesse obtenus dans des mains expérimentées sont tout à fait acceptables, faisant du DPI une technique réaliste et même recommandable en cas de risque génétique connu.

Remerciements

Le développement du DPI a été réalisé avec le soutien des Fonds Erasme et Lippens et du Fonds National de la Recherche Scientifique.

BIBLIOGRAPHIE

- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJA, Delhanty JDA, Winston RML, Tuddenham EGD : Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989 ; 1 : 347-9
- Delhanty JDA : Preimplantation diagnosis. *Prenat Diagn* 1994 ; 14 : 1217-27
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J : Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995 ; 64 : 382-91
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S : Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing *in vitro* fertilization with a poor prognosis : identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999 ; 72 : 837-44
- Munne S, Cohen J, Sable D : Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* 2002 ; 78 : 234-6
- Vidal F, Gimenez C, Rubio C *et al.* : FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998 ; 15 : 310-3
- Munné S, Marquez C, Reing A, Garrisi J, Alikani M : Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998 ; 69 : 904-8
- Magli MC, Gianaroli L, Munné S, Ferraretti AP : Incidence of Chromosomal Abnormalities from a Morphologically Normal Cohort of Embryos in Poor-Prognosis Patients. *J Assist Reprod Genet* 1998 ; 15 : 297-301
- Gianaroli L, Magli MC, Munné S, Fiorentino A, Montanaro N, Ferraretti AP : Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy ? *Hum Reprod* 1997 ; 12 : 1762-7
- Munné S, Magli MC, Bahçe M *et al.* : Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births : XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 1998 ; 18 : 1459-66
- Bahçe M, Cohen J, Munné S : Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy : were we looking at the wrong chromosomes ? *J Assist Reprod Genet* 1999 ; 16 : 176-81
- Donoso P and Devroey P : PGD for aneuploidy screening : an expensive hoax ? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007 ; 21 : 157-68
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E *et al.* : Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy *screening* in couples with advanced maternal age : a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004 ; 19 : 2849-58
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM : Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990 ; 344 : 768-70
- Sermon KD, Michiels A, Harton G *et al.* : ESHRE PGD Consortium data collection VI : cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod* 2007 ; 22 : 323-36
- Emiliani S, Gonzalez-Merino E, Van den Bergh M *et al.* : Re-analysis by fluorescence *in situ* hybridisation of spare embryos cultured until Day 5 after preimplantation genetic diagnosis for a 47, XYY infertile patient demonstrates a high incidence of diploid mosaic embryos : a case report. *Prenat Diagn* 2000 ; 20 : 1063-6
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V *et al.* : Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body FISH analysis. *J Assist Reprod Genet* 1998 ; 15 : 285-9
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH : Trophoctoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod* 1990 ; 5 : 821-5
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP : Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 2005 ; 84 : 1628-36
- Kalousek DK, Dill FJ : Chromosomal Mosaicism Confined to the Placenta in Human Conceptions. *Science* 1983 ; 221 : 665-7
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside AH : Human preimplantation development *in vitro* is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990 ; 5 : 708-14
- Kalousek DK, Vekemans M : Confined placental mosaicism. *J Med Genet* 1996 ; 33 : 529-33
- Gonzalez-Merino E, Emiliani S, Vassart G *et al.* : Incidence of chromosomal mosaicism in human embryos at different

- developmental stages analyzed by fluorescence *in situ* hybridization. Genet Test 2003 ; 7 : 85-95
24. Delhanty JDA, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RML : Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. Hum Genet 1997 ; 99 : 755-60
25. Bielanska M, Tan SL, Ao A : Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro* : incidence, type, and relevance to embryo outcome. Hum Reprod 2002 ; 17 : 413-9
26. Delhanty JDA, Handyside AH : The origin of genetic defects in man and their detection in the preimplantation embryo. Hum Reprod Update 1995 ; 1 : 201-15
27. Siozios M, Gonzalez-Merino E, Emiliani S *et al.* : Evolutive pregnancy after preimplantation genetic diagnosis in an infertile HIV-infected serodiscordant couple carrier for sickle cell anaemia : A case report. Poster présenté lors du 18^{ème} meeting scientifique de la «Belgian Society for Reproductive Medicine» (BSRM), Meise, 26 octobre 2007
28. Englert Y, Van Vooren JP, Place I, Liesnard C, Laruelle C, Delbaere A : ART in HIV-infected couples : has the time come for a change of attitude ? Hum Reprod 2001 ; 16 : 1309-15
29. Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP *et al.* : Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. Hum Reprod Update 2004 ; 10 : 149-62
30. Lesage B, Vannin AS, Emiliani S, Debaisieux L, Englert Y, Liesnard C : Development and evaluation of a qualitative reverse transcriptase nested polymerase chain reaction protocol for same day viral validation of human immunodeficiency virus type 1 ribonucleic acid in processed semen. Fertil Steril 2006 ; 86 : 121-8

Correspondance et tirés à part :

E. GONZALEZ-MERINO
Hôpital Erasme
Clinique de Fertilité
Route de Lennik 808
1070 Bruxelles
E-mail : ergonzal@ulb.ac.be

Travail reçu le 22 novembre 2007 ; accepté dans sa version définitive le 18 mars 2008.