

Diagnostics génétique préimplantatoire : techniques et résultats

Stéphane Viville, Pierre Ray, Brigitte Viville,
Alan Handyside, Pierre Gerlinger

Le diagnostic préimplantatoire présente une alternative au diagnostic prénatal pour des couples à risque de transmettre à leur enfant une maladie génétique grave. En effet, il présente l'avantage de caractériser le statut génétique de l'embryon avant son implantation, ce qui permet d'éviter

une interruption médicale de grossesse. La réalisation d'un DPI implique une fécondation in vitro et des techniques dérivant de la biologie moléculaire telles que l'amplification en chaîne par la polymérase et l'hybridation in situ avec des sondes fluorescentes. Elles permettent la détermination du sexe des embryons ou la caractérisation directe

de mutations pour les maladies telles que la mucoviscidose, le syndrome de Lesch-Nyhan ou la maladie de Tay-Sachs. Quatorze centres pratiquent le DPI à travers le monde, et les deux tiers des diagnostics concernent la détermination du sexe pour éliminer les embryons de sexe masculin à risque d'une maladie liée au chromosome X.

Le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) repose sur l'analyse du contenu génétique d'un embryon humain obtenu par fécondation *in vitro* (FIV). Il présente l'avantage majeur de pouvoir proposer à un couple, présentant un risque élevé de transmettre à leur enfant une maladie génétique d'une particulière gravité, de caractériser la mutation responsable avant l'implantation des embryons et ainsi de leur éviter une interruption médicale de grossesse (IMG). En effet, un DPI permet de caractériser le statut génétique des embryons obtenus par FIV et donc de ne transférer que des embryons sains. Actuellement, cette technique qui en est encore à un stade préliminaire, permet de déterminer le sexe des embryons, donc de proposer un DPI pour la plupart des maladies géné-

tiques liées au chromosome X, mais elle est aussi proposée pour un certain nombre de maladies autosomiques récessives [1]. Le DPI fait appel à deux techniques de biologie moléculaire : l'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) et l'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH). L'ensemble des techniques utilisées pour réaliser un DPI ainsi que les résultats déjà obtenus sont présentés dans cet article.

Les techniques

La procédure technique complète pour réaliser un DPI implique une fécondation *in vitro* et, selon les cas, une biopsie embryonnaire [2], le prélèvement par micromanipulations d'un globule polaire [3] ou d'un ou deux blastomères [4] ou encore de

cellules trophoblastiques [5], selon le stade auquel est réalisée la biopsie (figure 1). Enfin, elle nécessite la caractérisation par des techniques de biologie moléculaire du contenu génétique du matériel prélevé.

Les DPI sont réalisés en majorité sur des blastomères prélevés au troisième jour après la fécondation, ce qui correspond théoriquement à un stade huit cellules (de six à dix en réalité). Quelques centres travaillent sur les globules polaires pour mettre en évidence une mutation ou une aneuploïdie [3, 6]. Cependant, il a été montré que, pour être fiable, ce test nécessite l'analyse du premier et du deuxième globule polaire [7]. De plus, une telle approche ne permet l'analyse que du génome d'origine maternelle. L'analyse à partir de cellules trophoblastiques prélevées sur des blastocystes est peu pratiquée en raison des diffi-

RÉFÉRENCES

- Harper J, Handyside AH. The current status of preimplantation diagnosis. *Curr Obstet Gyn* 1994; 4: 143-9.
- Tarin JJ, Handyside AH. Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 943-52.
- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of the first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 1995; 10: 1014-20.
- Tarin JJ, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH. Human embryo biopsy on the 2nd day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of a quarter of embryo retards cleavage. *Fertil Steril* 1992; 58: 970-6.
- Dokras A, Sargent IL, Gardner RL, Barlow DH. Human trophoblast biopsy and secretion of chorionic gonadotrophin. *Hum Reprod* 1991; 6: 1453-9.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Evisikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 1992; 12: 103-10.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhmenko V, Wolf G, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent *in situ* hybridization. *Hum Reprod* 1995; 10: 1923-7.
- Menezo YJ, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990; 42: 301-6.
- 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.
- Handyside A. Biopsy of human cleavage stage embryos and sexing by DNA amplification. In: *Preimplantation genetics*, Verlinsky Y, Kuliev A, New York: Plenum Press, 1991: 75-83.
- Chong SS, Kristjansson K, Cota J, Handyside AH, Hughes MR. Preimplantation prevention of X-linked disease: reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis of simultaneously amplified ZFX and ZFY sequences. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1187-91.
- Levinson G, Fields RA, Harton GL, Palmer FT, Maddalena A, Fugger EF, Schulman JD. Reliable gender screening for human preimplantation embryos, using multiple DNA target-sequences. *Hum Reprod* 1992; 7: 1304-13.
- Liu J, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Amplification of X- and Y-chromosome-specific regions from single human blastomeres by polymerase chain reaction for sexing of preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1994; 9: 716-20.
- Grifo JA, Tang YX, Cohen J, Gilbert F, Sanyal MK, Rosenwaks Z. Pregnancy after embryo biopsy and coamplification of DNA from X and Y chromosomes. *J Am Med Assoc* 1992; 268: 727-9.

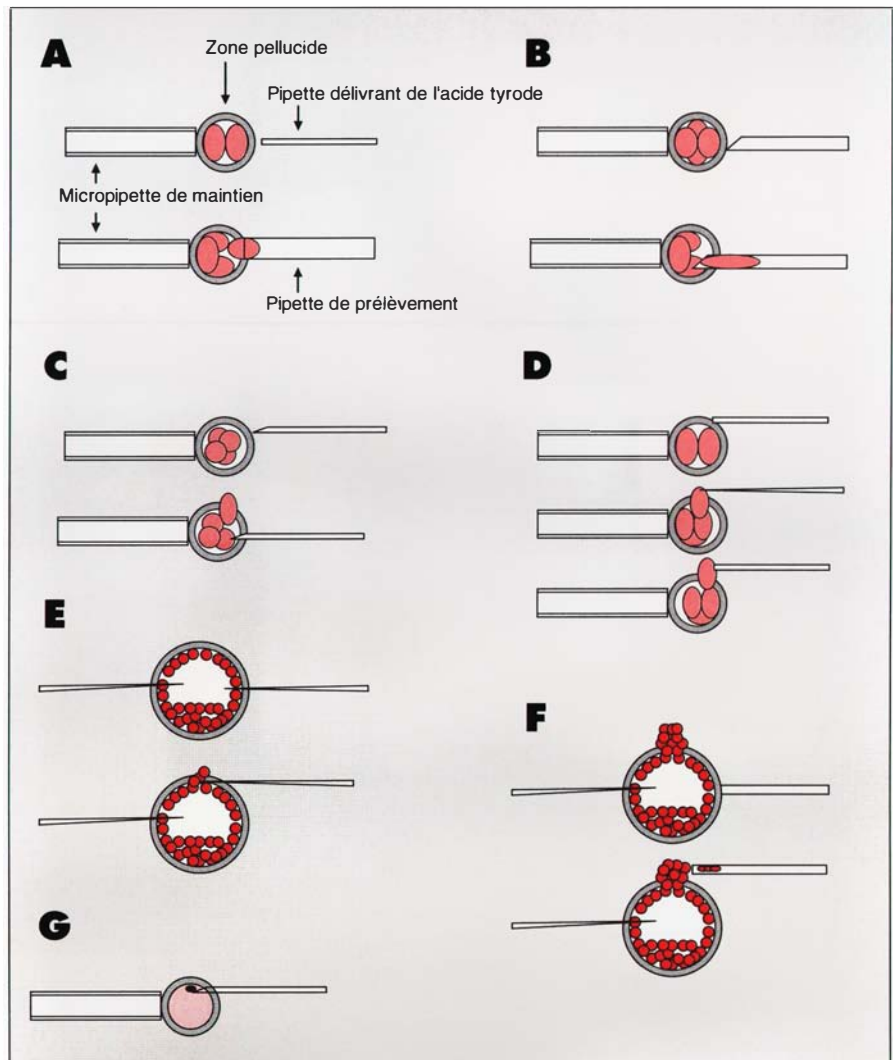


Figure 1. **Technique de biopsies pour la réalisation sur DPI.** Le DPI implique toujours une fécondation *in vitro* et, selon les cas, une biopsie embryonnaire avec prélèvement de blastomères sur un embryon de trois jours (A-D), le prélèvement de cellules trophoblastiques (E, F) ou d'un globule polaire (G). A-D: Dans tous les cas l'embryon est maintenu à l'aide d'une pipette de maintien: A. Une première pipette délivrant de l'acide tyrode perce un trou dans la zone pellucide. Une deuxième pipette, de prélèvement, aspire un ou deux blastomères. B. Le ou les blastomères sont directement prélevés à l'aide d'une pipette aiguisée. C. Une pipette aiguisée perce un trou dans la zone pellucide par lequel les blastomères sont ensuite extrudés par l'injection de milieu dans l'embryon. D. Un trou est réalisé à l'aide d'acide tyrode dans la zone pellucide par lequel les blastomères sont ensuite tirés soit à l'aide d'une pipette effilée soit par succion. E-F: Prélèvement de cellules trophoblastiques. E. Le blastocyste est maintenu à l'aide d'une pipette effilée, une deuxième pipette perfore la zone pellucide et retire des cellules trophoblastiques. F. Une pipette effilée perfore le blastocyste, en quelques heures il va se former une hernie de cellules trophoblastiques qui pourront être prélevées. G. Prélèvement du premier globule polaire, directement en piquant à travers la zone pellucide avec une pipette aiguisée.

RÉFÉRENCES

15. Cui KH, Warnes GM, Jeffrey R, Matthews CD. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification (see comments). *Lancet* 1994; 343: 79-82.
16. Coonen E, Dumoulin JC, Ramaekers FC, Hopman AH. Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Reprod* 1994; 9: 533-7.
17. Griffin DK, Handyside AH, Harper JC, Wilton LJ, Atkinson G, Soussis I, Wells D, Kontogianni E, Tarin J, Geber S, et al. Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent *in situ* hybridization. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11: 132-43.
18. Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994; 9: 721-4.
19. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, mono-spermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995; 15: 41-9.
20. Verlinsky Y, Rechitsky S, Freidine M, Cieslak J, Strom C, Lifchez A. Birth of a healthy girl after preimplantation gender determination using a combination of polymerase chain reaction and fluorescent *in situ* hybridization analysis. *Fertil Steril* 1996; 65: 358-60.
21. Plachot M. Viability of preimplantation embryos. *Clin Obstet Gynaecol* 1992; 6: 327-38.
22. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 2185-91.
23. Harper JC, Dawson K, Delhanty JDA, Winston ML. The use of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for the analysis of *in vitro* fertilization embryos: a diagnostic tool for the infertile couple. *Hum Reprod* 1995; 10: 3255-8.
24. Pellestor F, Girardet A, Andréo B, Lefort G, Charlieu J. The PRINS technique: potential use for rapid preimplantation embryo chromosome screening. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 135-8.
25. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after *in vitro* fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis (see comments). *N Engl J Med* 1992; 327: 905-9.
26. Gibbons WE, Gitlin SA, Lanzendorf SE, Kaufmann RA, Slotnick RN, Hodgen GD. Preimplantation genetic diagnosis for Tay-Sachs disease: successful pregnancy after pre-embryo biopsy and gene amplification by polymerase chain reaction. *Fertil Steril* 1995; 63: 723-8.

cultés de culture des embryons humains [5, 8]. Cependant, elle présente l'avantage de pouvoir prélever un plus grand nombre de cellules, ce qui augmente considérablement la fiabilité du test et affecte moins le développement de l'embryon.

Deux techniques de biologie moléculaire ont cours actuellement. L'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) est utilisée pour déterminer le sexe des embryons et pour mettre en évidence des mutations. La réalisation de cette technique, qui prend de six à huit heures, permet de transférer le jour même les embryons sur lesquels le diagnostic aura été effectué.

La détermination du sexe des embryons par PCR est peu à peu remplacé par la FISH, permettant non seulement de déterminer le sexe des embryons mais également de mettre en évidence certaines aneuploïdies.

La détermination du sexe des embryons

Les maladies liées au chromosome X, (il en existe plus de 200), sont une des indications majeures du DPI. La détermination du sexe permet d'avoir un seul diagnostic pour un grand nombre de maladies; en outre, il n'y a pas d'autre moyen de limitation du risque de transmettre des maladies liées à l'X pour lesquelles la ou les mutations ne sont pas encore caractérisées. Enfin, pour des raisons techniques liées au peu de matériel disponible pour réaliser le DPI, le test génétique qu'on a pu mettre au point pour certaines maladies génétiques liées au chromosome X n'est pas réalisable. En attendant la miniaturisation de ces tests sur une seule cellule une détermination du sexe des embryons est proposée, même si cela implique le rejet d'embryons sains, en théorie un quart des embryons analysés.

• Méthode par PCR

Handyside *et al.* (Londres, GB) furent les premiers à décrire l'obtention de grossesses après la détermination du sexe d'embryons obtenus *in vitro* [9]. Cette détermination du

sexe des embryons avait été proposée à cinq couples à risque de transmettre une maladie liée au chromosome X (retard mental lié à l'X, adrénoleucodystrophie, syndrome de Lesh-Nyhan et myopathie de Duchenne). L'approche utilisée pour ce travail était d'amplifier par PCR un fragment d'ADN répété spécifique du chromosome Y (fragment DZY1), l'absence d'amplification attestant de la féminité de l'embryon. Une telle approche conduisit à la naissance de deux filles saines mais aussi à un faux diagnostic par défaut d'amplification [10]. Depuis, la détermination du sexe de l'embryon par PCR se fait en utilisant un contrôle interne d'amplification. Différentes techniques sont utilisées: on peut utiliser des oligonucléotides qui vont co-amplifier des gènes homologues des chromosomes X et Y tels que les gènes *ZFX* et *ZFY* [11] ou les gènes de l'amélogénine [12] ou les gènes de la stéroïde sulfatase [13]. L'identification de l'origine des fragments amplifiés est possible grâce à l'existence d'un polymorphisme de restriction ou d'une différence de taille. Mais il est aussi possible de réaliser une PCR dite « multiplex » qui consiste à utiliser dans un même tube plusieurs jeux d'oligonucléotides afin d'amplifier simultanément plusieurs fragments d'ADN différents. Pour la détermination du sexe, un fragment du chromosome Y et, soit un fragment du chromosome X [14], soit un fragment d'un chromosome autosomique (un fragment du gène codant pour *ZP3* localisé sur le chromosome 7) sont amplifiés simultanément [15].

• Méthode par FISH

La technique de FISH présente des avantages certains par rapport à la PCR: elle est aussi fiable et aussi spécifique que la PCR [16, 17]; elle ne présente pas les problèmes de contamination liés à la PCR (particulièrement à partir d'une seule cellule); l'ensemble de la procédure peut être réalisé sous microscope en visualisant le ou les noyaux étudiés; elle demande un temps de manipulation très réduit par rapport à la PCR

RÉFÉRENCES

27. Liu J, Lissens W, Van Broeckhoven C, Lofgren A, Camus M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Normal pregnancy after preimplantation DNA diagnosis of a dystrophin gene deletion. *Prenat Diagn* 1995; 15: 351-8.
28. Ray P, Winston R, Handyside A. Single cell analysis for diagnosis of cystic fibrosis and Lesh-Nyhan syndrome in human before implantation. *Miami Biotechnology*. 1994.
29. Monk M, Kenealy MR, Mohadjerani S. Detection of both the normal and mutant alleles in single cells of individuals heterozygous for the sickle cell mutation—prelude to preimplantation diagnosis. *Prenat Diagn* 1993; 13: 45-53.
30. Ray P, Kaeda J, Bingham J, Roberts I, Handyside A. Preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia major: accurate detection of mutations in a compound heterozygote following single cell amplification. *Lancet* 1996; 347: 1696.
31. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5847-51.
32. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235: 1616-22.
33. Kristjansson K, Chong SS, Van den Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes MR. Preimplantation single cell analyses of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nature Genet* 1994; 6: 19-23.
34. Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, Kristjansson K, DiSepio D, Hughes MR. Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6181-5.
35. Sermon K, Lissens W, Joris H, Van Steirteghem A, Liebaers. Adaptation of the primer extension preamplification (PEP) reaction for preimplantation diagnosis: single blastomere analysis using short PEP protocols. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 209-12.
36. Findlay I, Urquhart A, Quirke P, Sullivan K, Rutherford AJ, Lilford RJ. Simultaneous DNA «fingerprinting», diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. *Hum Reprod* 1995; 10: 1005-13.
37. Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl* 1993; 3: 13-22.
38. Thornhill A, Holding C, Monk M. Recycling the single cell to detect specific chromosomes and to investigate specific gene sequences. *Hum Reprod* 1994; 9: 2150-5.

puisque le diagnostic peut être établi en deux heures [18]. Elle met aussi en évidence les aneuploïdies des chromosomes X et Y, ce qui n'est actuellement pas possible par PCR [19]. Après prélèvement des blastomères, la procédure consiste à les fixer sur une lame, à les débarrasser de leur cytoplasme, à dénaturer l'ADN avant de procéder à l'hybridation avec les sondes souhaitées. Pour la détermination du sexe des embryons, on utilise une sonde spécifique du chromosome X, généralement la sonde pBamX5, et une sonde spécifique du chromosome Y, la sonde DYZ1 [18]. Depuis peu Harper *et al.* utilisent, en outre, une sonde du chromosome 1 (pUC1.77) afin de détecter certaines aneuploïdies [19]. Certains auteurs utilisent deux sondes du chromosome Y afin d'augmenter la fiabilité du test.

• Combinaison des deux méthodes PCR et FISH

Afin d'augmenter la fiabilité de la détermination du sexe des embryons Verlinsky *et al.* proposent de prélever deux blastomères et de réaliser sur l'un une PCR et sur l'autre une FISH. Seuls les embryons présentant des résultats concordants entre les deux techniques sont réimplantés. Cette méthode permet non seulement de déterminer le sexe des embryons de façon plus fiable mais aussi de mettre en évidence d'éventuelles aneuploïdies [20]. Les résultats cliniques d'une telle détermination du sexe d'embryons seront décrits ultérieurement.

Détection d'aneuploïdies

On a vu que la technique de FISH permet aussi de mettre en évidence des aneuploïdies. Cette forme de DPI, qui est proposée, soit pour les femmes âgées, soit pour les échecs répétés de FIV [7, 21-23], n'est réalisable actuellement que pour les chromosomes X, Y, 18 et 13/21. Cette limitation provient de la nécessité d'utiliser des sondes centromériques répétées afin d'obtenir rapidement un signal sur une seule cellule. Malheureusement ces sondes manquent de spécificité.

Un progrès possible est l'utilisation d'une nouvelle technique, décrite par Pellestor *et al.*, la PRINS (pour *primed in situ labelling*) qui permet de marquer les chromosomes de façon spécifique [24]. Elle consiste à utiliser un oligonucléotide spécifique d'un fragment d'ADN localisé sur le chromosome étudié. Il s'agit généralement de séquences répétées. Cet oligonucléotide sert d'amorce à la Taq polymérase qui, en présence de nucléotides marqués, va permettre la détection du chromosome souhaité. Une telle technique semble très prometteuse dans la mesure où elle est réalisable sur une seule cellule dans un temps comparable à celui nécessaire à la FISH. L'utilisation de différents nucléotides marqués permet, l'examen simultané de plusieurs chromosomes. Cette élongation à partir d'oligonucléotides semble rendre plus spécifique la réaction ce qui permet la détection d'un plus grand nombre de chromosomes.

Une telle approche devrait non seulement permettre de déterminer le sexe des embryons mais aussi d'étudier la majorité des aneuploïdies, voire de mettre en évidence des translocations, ce qui reste difficile par FISH, particulièrement sur des noyaux en interphase.

Notons qu'à l'heure actuelle, il n'est pas possible, pour des raisons techniques, de réaliser un diagnostic d'anomalies de la structure chromosomique à partir d'une cellule unique, d'autant plus que cette cellule est généralement en interphase.

Détection de mutations

La détection d'une mutation n'est réalisable qu'à l'aide de la PCR et est donc soumise à toutes les limitations de cette technique. Dans la plupart des cas, étant donné le peu d'ADN disponible il est nécessaire de réaliser une PCR nichée (*nested PCR*), ce qui impose deux séries successives d'amplification (de 20 à 25 cycles chacune); la seconde série utilise des amorces internes par rapport à celles utilisées pour la première.

Selon la mutation étudiée, différentes méthodes de caractérisation sont possibles. Dans le cas le plus simple, les fragments amplifiés de

type normal et muté ont une taille suffisamment différente pour être séparés sur un gel d'électrophorèse; malheureusement, c'est rarement le cas. Différentes astuces ont été élaborées dont nous n'exposerons que celles déjà utilisées dans le cadre d'un DPI.

• Détection par formation d'hétéroduplex

Le principe d'une telle méthode est décrit dans la *figure 2*. Elle est fondée sur le fait que deux fragments identiques mais dont l'un, l'allèle muté

comprend une délétion minimale, de trois paires de bases par exemple, vont pouvoir former après dénaturation et renaturation quatre types de molécules, deux homoduplex correspondant aux deux fragments initiaux et deux hétéroduplex formés de l'association d'un brin de type normal et d'un brin muté. La particularité de ces deux populations est qu'elles vont se comporter différemment sur gel d'électrophorèse. En effet, alors que sur une électrophorèse classique il n'est pas possible de distinguer deux fragments d'ADN ne différant que par trois paires de

bases, les homoduplex et les hétéroduplex migrent de façon bien distincte. Cette méthode est couramment utilisée pour caractériser la mutation $\Delta F508$ qui affecte le gène *CFTR* [25], qui est la mutation la plus fréquente (70 % des cas) responsable de la mucoviscidose. Le principe en est expliqué dans la *figure 2*. Une telle stratégie est aussi utilisée pour détecter la délétion de quatre paires de bases TSD-11 dans le gène de la β -hexosaminidase A impliquée dans le syndrome de Tay-Sachs [26]. C'est une méthode simple, efficace, et surtout rapide : en effet, la dénaturation

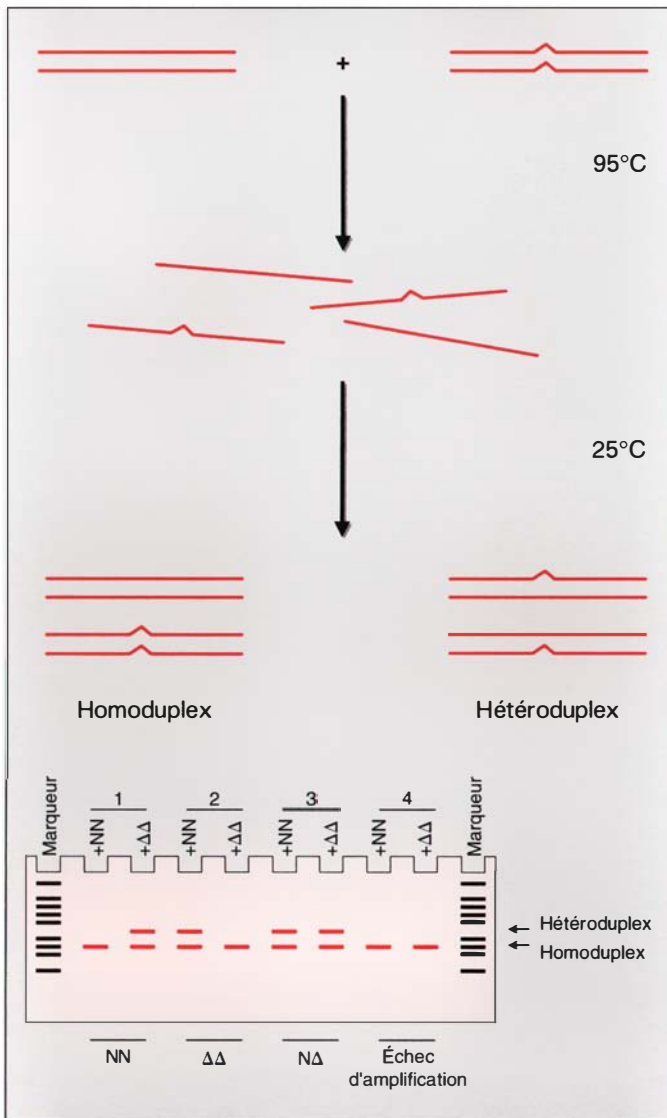


Figure 2. **Détection d'une mutation par formation d'hétéroduplex.** Des fragments d'ADN double brin, identiques à une délétion près, vont après dénaturation à la chaleur (95 °C) pouvoir s'apparier à température ambiante (25 °C) et former quatre types de complexes : les deux fragments initiaux appelés homoduplex; deux fragments composés chacun d'un brin de type normal et d'un brin de type mutant, on parle alors d'hétéroduplex. Du fait du mésappariement, les hétéroduplex possèdent une conformation plus volumineuse que les homoduplex. Cette propriété permet de distinguer les hétéroduplex des homoduplex par simple électrophorèse. Pour analyser une réaction de PCR deux échantillons sont prélevés et mélangés à un fragment, soit de type normal, soit de type mutant. Après formation des hétéroduplex trois possibilités se présentent selon le statut génétique de la cellule analysée : (1) si elle est homozygote normale (NN), il n'y a formation d'hétéroduplex qu'avec le fragment de type mutant ; (2) si elle est homozygote mutante ($\Delta\Delta$), il n'y a formation d'hétéroduplex qu'avec le fragment de type normal ; (3) si elle est hétérozygote (N Δ), il y a formation d'hétéroduplex avec le fragment de type normal et avec le fragment de type mutant ; (4) il existe une quatrième possibilité qui est l'échec d'amplification ; dans ce cas, il n'y a pas formation d'hétéroduplex.

RÉFÉRENCES

39. Rechitsky S, Freidine M, Verlinsky Y, Strom C. Allele dropout in sequential PCR and FISH analysis of single cells (cell recycling). *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 115-124.
40. Levinson G, Keyvanfar K, Wu JC, Fugger EF, Fields RA, Harton GL, Palmer FT, Sisson ME, Starr KM, Dennison-Lagos L, et al. DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease. *Hum Reprod* 1995; 10: 979-82.
41. Sermon K, Lissens W, Tarlatzis B, Braude PR, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Beta-N-acetylhexosaminidase activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1992; 7: 1278-80.
42. Epstein M, Avital Y, Agmon V, Dinur T, Fibach E, Gatt S, Laufer N. Diagnosing sphingolipidoses in murine and human embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 302-9.
43. Pellestor F. Étude cytogénétique de l'embryon humain. *médecine/sciences* 1993; 9: 716-24.
44. Benkhalifa M, Janny L, Vye P, Malet P, Boucher D, Menezo Y. Assessment of ploidy in human morulae and blastocysts using co-culture and fluorescent *in situ* hybridization. *Hum Reprod* 1993; 8: 895-902.
45. Coonen E, Dumoulin J, Dreesen J, Marijke Bras J, Evres J, Geraedts P. Clinical application of Fish for sex determination of embryos in preimplantation diagnosis of X-linked diseases. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 133-6.
46. Harper J, Delhanty J. Detection of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos using FISH. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 137-9.
47. Liu J, Lissens W, Silber SJ, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis delta F508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm. *J Am Med Ass* 1994; 272: 1858-60.
48. Pickering SJ, McConnell JM, Johnson MH, Braude PR. Use of a polymorphic dinucleotide repeat sequence to detect non-blastomeric contamination of the polymerase chain reaction in biopsy samples for preimplantation diagnosis. *Hum Reprod* 1994; 9: 1539-45.
49. Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford AJ, Lilford RJ. Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 1609-18.
50. Gitlin S, Lanzendorf S, Gibbons W. Polymerase chain reaction amplification specificity: incidence of allele dropout using different DNA preparation methods for heterozygous single cells. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 107-11.

des fragments et leur renaturation sont réalisés en dix minutes.

• Détection par l'absence d'amplification

La détection de délétions peut être fondée sur l'absence d'amplification. En effet, si la délétion est suffisamment importante, il est possible d'utiliser des oligonucléotides amplifiant un fragment compris à l'intérieur du fragment d'ADN délété. Ainsi, le type normal homozygote ou l'hétérozygote pourront donner une amplification alors que la mutation à l'état homozygote sera mise en évidence par l'absence d'amplification. Une telle approche a été utilisée pour caractériser une délétion impliquée dans la myopathie de Duchenne [27]. Cette technique n'est utilisable que pour des maladies récessives car elle ne permet pas de différencier l'état homozygote normal de l'état hétérozygote, ce qui implique que des embryons hétérozygotes puissent être transférés. De plus, la technique ne peut être réalisée que dans le cas où c'est l'absence d'amplification qui caractérise la mutation. Ainsi, il n'y a pas de risque de transférer des faux négatifs qui seraient des embryons portant la mutation. En revanche, si l'absence d'amplification caractérisait l'état normal il y aurait des risques, lors d'échecs d'amplification qui sont fréquents, de réimplanter des embryons mutants. C'était l'approche utilisée initialement par Handyside *et al.* (Londres, GB) pour déterminer le sexe des embryons. Leur test était fondé sur l'absence d'amplification d'un fragment du chromosome Y pour la détermination du sexe des embryons [9].

• Présence d'un polymorphisme de restriction

Il arrive que des mutations introduisent ou modifient un site de restriction créant par là même un polymorphisme de restriction qui pourra être utilisé pour caractériser la mutation. Cela a été décrit pour la détection d'une mutation impliquée dans le syndrome de Lesh-Nyhan. Dans ce cas particulier la mutation abolit un site XhoI [28]. Après amplification la

digestion du produit de PCR permet de caractériser la mutation. Puisque le gène *HPRT* est sur le chromosome X il est même possible de déterminer les embryons filles hétérozygotes.

D'autres exemples sont la mutation responsable de l'anémie falciforme [29] et deux mutations impliquées dans la β -thalassémie [30].

Futures techniques de DPI

Parmi l'ensemble des techniques susceptibles d'améliorer la pratique du DPI, nous nous limiterons à celles qui ont déjà été testées sur une seule cellule.

• La PEP

Un problème majeur inhérent aux techniques de PCR décrites est la nécessité de développer un test PCR pour chaque mutation différente étudiée. En effet, il n'existe à l'heure actuelle, si ce n'est la détermination du sexe des embryons, aucune méthode qui permette de détecter en un seul test l'ensemble des mutations dont peut être affecté un gène. C'est pour cette raison que la technique dite de préamplification du génome (PEP *primer extension preamplification*) est très intéressante [31]. Elle consiste à utiliser, lors d'une première réaction d'amplification, un ensemble d'oligonucléotides de 15 bases, représentant le plus grand nombre de séquences possibles, et permettant d'amplifier 95 % du génome; cette technique augmente donc de façon considérable la quantité de matériel de départ. Il est alors possible, sur des échantillons de cette première amplification de réaliser plusieurs réactions de PCR. Une préamplification permet d'envisager non plus la caractérisation de la mutation, mais l'identification de l'allèle porteur de la mutation, quelle que soit la mutation. En effet, cette technique permet de réaliser plusieurs amplifications à partir d'une cellule, et donc d'amplifier des microsatellites polymorphes qui permettront d'identifier les différents allèles [32]. Une telle approche présente aussi l'avantage de pouvoir pro-

poser un DPI pour des mutations qui sont difficilement ou non identifiables directement. C'est le cas de l'ensemble des maladies dues à la répétition de trinuécléotides comme pour le syndrome de l'X-fragile ou la chorée de Huntington.

Différents essais réalisés sur des cellules uniques ont permis une analyse de plusieurs exons du gène de la dystrophie musculaire de Duchenne, des exons 11 et 12 du gène de la maladie de Tay-Sachs, de la mutation $\Delta F508$ du gène *CFTR*, de l'intron 18 du facteur VIII et des fragments *ZFX* et *ZFY*, à partir d'une cellule unique [33, 34]. Mais de tels protocoles ne sont pas applicables car trop longs. L'utilisation d'une machine de type GeneAmp System 9600 (Perkin Elmer) qui permet de réduire considérablement les temps des différentes étapes de la PCR devrait rendre utilisable une telle technique pour le DPI. Sermon *et al.* (Bruxelles, Belgique) ont pu établir un protocole court de PEP qui permet de réaliser l'ensemble du DPI en moins de six heures [35].

• La PCR fluorescente

Le principe de la PCR fluorescente est d'utiliser des oligonucléotides marqués par un fluorochrome. La détection du signal fluorescent se fait à l'aide d'un séquenceur automatique. Cela présente l'avantage considérable de pouvoir mettre en évidence des différences de taille minimales entre deux fragments d'ADN, en théorie une paire de base. En outre, le seuil de détection étant considérablement abaissé (jusqu'à 1 000 fois), il n'est plus nécessaire de réaliser autant de cycles d'amplification, la PCR nichée n'est plus nécessaire [36] cela devrait rendre possible l'utilisation de la PEP pour le DPI. Surtout, ces deux techniques combinées devraient permettre de mettre au point des tests identifiants, non pas la mutation, mais l'allèle porteur, efficaces donc pour l'ensemble des mutations pouvant affecter un gène donné.

De tels tests seront fondés sur l'amplification de séquences microsatellites (STR *small tandem repeats*). Il s'agit de séquences non codantes du génome, constituées de la répétition en tandem de quelques nucléotides.

L'intérêt de telles séquences réside dans l'important polymorphisme de taille qu'elles présentent (la taille variant de quelques dizaines ou centaines de paires de bases). On définit l'informativité de ce polymorphisme par la probabilité d'avoir des allèles d'un même chromosome porteurs de STR différentes [37]. Ainsi, il est possible d'utiliser une STR très polymorphe pour caractériser un locus donné sur un chromosome. La principale limitation d'une telle approche est la nécessité d'avoir une STR proche du gène étudié de façon à limiter les possibilités de recombinaison entre la STR et le gène étudié. Pour bien faire, il faudrait caractériser plusieurs STR, ce qui devrait être faisable grâce à la PEP ou à la PCR multiplex qui permet d'amplifier plusieurs locus en même temps.

• Le recyclage d'une cellule

Thornill *et al.* (Londres, GB) [38] ont établi une technique qui permet, à partir d'une seule cellule, de réaliser à la fois une PCR et une FISH. La cellule, fixée sur un morceau de lamelle, est introduite dans un tube contenant les réactifs nécessaires à la PCR nichée. Après le premier cycle de PCR, un échantillon est utilisé pour faire le deuxième cycle alors que le morceau de lamelle est récupéré pour réaliser la FISH. Ces travaux, réalisés sur des blastomères de souris, présentent une efficacité de 70 % pour la détection par PCR du gène de l'hémoglobine β et de 74 % pour la détermination du sexe des blastomères.

Rechitsky *et al.* (Chicago, IL, USA) ont testé cette technique sur des fibroblastes humains afin d'en établir la reproductibilité et la fiabilité. Différents locus ont ainsi été étudiés. La conclusion de leur travail est la nécessité d'améliorer les conditions, et de PCR, et de FISH. Ils obtiennent des efficacités pour la PCR et la FISH variant de 82 % à 85 % mais un taux d'absence d'amplification ou d'amplification préférentielle de plus de 12 %, trop élevé pour être utilisé en clinique [39].

• Le tri des spermatozoïdes

Levinson *et al.* (Fairfax, VA, USA) ont récemment réalisé un DPI après

avoir trié les spermatozoïdes par cytométrie de flux. Ils arrivent ainsi à purifier à 86 % les spermatozoïdes femelles qui sont alors utilisés pour une FIV et réaliser un DPI. Sur les deux tentatives publiées, ils obtiennent dans un cas 7 embryons femelles sur 8, et dans le deuxième cas 15 embryons femelles sur 16 [40]. On peut envisager, si les résultats sont confirmés, qu'une telle technique, fondée sur la coloration des spermatozoïdes au colorant Hoechst (dont l'entière innocuité reste à démontrer) permette d'éviter un DPI pour les maladies liées au chromosome X.

• Diagnostic biochimique

A l'heure actuelle, seuls les diagnostics génétiques ont une sensibilité suffisante pour permettre un diagnostic à partir d'une cellule unique. Cependant, certaines équipes tentent de développer des techniques biochimiques pour réaliser un DPI [41, 42].

Les difficultés techniques

Les difficultés sont de différents ordres. Les aspects éthiques et législatifs ont été mentionnés par ailleurs (*voir p. 1389*). Il nous reste à voir les difficultés techniques qui sont liées aux techniques de diagnostic et à la FIV.

Le peu de matériel disponible pour réaliser le diagnostic, généralement une cellule, au mieux deux, représente la contrainte majeure. En effet, si la PCR est une technique simple et facile à mettre en œuvre quand on dispose d'une quantité suffisante d'ADN (en général entre 100 et 20 ng), elle devient ardue quand il s'agit de la réaliser sur une cellule contenant 2 pg d'ADN. Les problèmes sont la contamination, l'amplification préférentielle d'un allèle, voire l'absence d'amplification d'un allèle (ADO *allele drop out*) si bien qu'efficacité et fiabilité ne sont jamais de 100 %.

• La qualité des embryons

Un des problèmes de tous les laboratoires pratiquant l'assistance médi-

RÉFÉRENCES

51. Ray P, Handyside A. 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.
52. Navidi W, Arnheim N. Using PCR in preimplantation genetic disease diagnosis (see comments). *Hum Reprod* 1991; 6: 836-49.
53. Verlinsky Y, Handyside A, Simpson JL, Edwards R, Kuliev A, et al. Current progress in preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10: 353-60.
54. Verlinsky Y, Handyside A, Grifo J, Munne S, Cohen J, et al. Preimplantation diagnosis of genetic and chromosomal disorders. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11: 236-43.
55. Harper J. Preimplantation diagnosis of inherited disease by embryo biopsy: an update of the world figures. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 90-5.
56. Grifo JA, Tang YX, Munne S, Alikani M, Cohen J, Rosenwaks Z. Healthy deliveries from biopsied human embryos. *Hum Reprod* 1994; 9: 912-6.
57. Avner R, Laufer N, Safran A, Kerem BS, Friedmann A, Mitrani Rosenbaum S. Preimplantation diagnosis of cystic fibrosis by simultaneous detection of the W1282X and delta F508 mutations. *Hum Reprod* 1994; 9: 1676-80.
58. Strom CM, Rechitsky S, Verlinsky Y. Reliability of gender determination using the polymerase chain reaction (PCR) for single cells. *J In vitro Fert Embryo Transf* 1991; 8: 225-9.
59. Munne S, Tang YX, Grifo J, Rosenwaks Z, Cohen J. Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence *in situ* hybridization. *Fertil Steril* 1994; 61: 111-7.
60. Verlinsky Y, Rechitsky S, Freidine M, Cieslak J, Strom C, Lifchez A. Birth of a healthy girl after preimplantation gender determination using a combination of polymerase chain reaction and fluorescent *in situ* hybridization analysis. *Fertil Steril* 1996; 65: 358-60.
61. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Atkinson GH, Winston RM, Delhanty JD. Diagnosis of sex in preimplantation embryos by fluorescent *in situ* hybridisation. *Br Med J* 1993; 306: 1382.
62. Veiga A, Santalo J, Vidal F, Calderon G, Gimenez C, Boada M, Egozcue J, Barri PN. Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection. *Hum Reprod* 1994; 9: 2156-9.
63. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, et al. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent *in situ* hybridization analysis. *Fertil Steril* 1996; 66: 126-9.
- cale à la procréation est la qualité des embryons obtenus en FIV [43]. Ce problème est important aussi pour la pratique du DPI. En effet, il est souhaitable d'obtenir des embryons de bonne qualité afin de s'assurer que le blastomère prélevé est nucléé. Les expériences de FISH sur les embryons humains ont mis en évidence des aneuploïdies ou un mosaïcisme pour un pourcentage élevé des embryons [19, 44-46]; ces embryons sont évidemment rejetés. Du fait du DPI, un certain nombre d'embryons de bonne qualité morphologique seront ainsi rejetés. Inversement, un DPI peut être réalisé sur une cellule normale provenant d'un embryon mosaïque. C'est une raison supplémentaire pour essayer, dans la mesure du possible, de réaliser le DPI sur deux blastomères par embryon. Après ces examens, le nombre d'embryons susceptibles d'être transférés est souvent limité, ce qui explique en partie pourquoi les résultats, en terme de grossesses obtenues, ne sont pas meilleurs que ceux de la FIV simple. Après un DPI, il n'est souvent pas possible de transférer plus d'un embryon, or les résultats sont considérablement améliorés par le transfert de deux embryons ou plus.

• Les sources de contamination

Les contaminations peuvent provenir de multiples sources (voir figure 3): (1) de l'opérateur: seules des précautions draconiennes permettent de les éviter. La manipulation des cellules et la préparation des milieux de PCR doivent se faire dans des locaux et à l'aide de pipettes réservées à cet usage, sous une hotte à flux laminaire avec gants, masque et charlotte. Les tampons de réaction sont filtrés et traités par les UV. Certains auteurs préconisent de traiter les réactifs, avant usage, par une enzyme de restriction coupant dans le fragment d'ADN à amplifier. Ainsi, s'il existe dans les milieux un ADN contaminant, il ne pourra pas être amplifié [13]; (2) des cellules de la *corona radiata*, des spermatozoïdes encore collés à l'embryon. Une attention particulière au moment du prélèvement d'un blastomère est nécessaire. Afin,

d'éviter les contaminations dues aux cellules de la *corona radiata*, un lavage à l'aide d'une pipette peut être effectué. Pour éviter des contaminations liées à la présence de spermatozoïdes, le laboratoire de van Steirteghem (Bruxelles, Belgique) réalise systématiquement une fécondation par injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) lorsqu'un DPI est nécessaire [47]. En effet, cela évite la présence de spermatozoïdes autour de la zone pellucide et supprime donc le risque d'en recueillir un ou plusieurs lors de la biopsie du ou des blastomères. La PEP et la PCR fluorescente représentent une solution à ces problèmes de contamination dans la mesure où il est alors possible d'amplifier non seulement la mutation diagnostiquée mais aussi des STR permettant d'attester de l'origine de l'ADN amplifié [48].

• Absence d'amplification ou amplification préférentielle d'un allèle

C'est un phénomène courant, encore inexpliqué, mais qui peut représenter jusqu'à 25 % des essais, qui fait qu'à partir d'une cellule diploïde un seul des deux allèles présents est amplifié. Les expériences de PCR fluorescentes

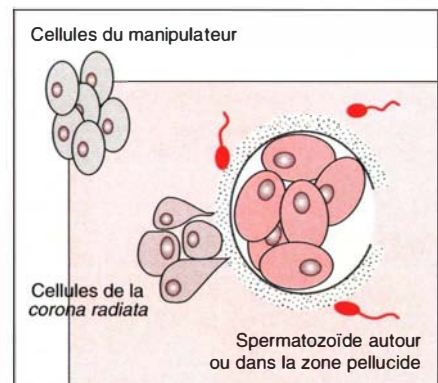


Figure 3. Les sources de contaminations lors de la réalisation d'une PCR à partir d'une cellule. Ces contaminations peuvent avoir différentes origines: (1) le manipulateur; (2) les cellules de la corona radiata ou des restes de ces cellules fixés à la zone pellucide; (3) les spermatozoïdes résiduels à proximité de la zone pellucide.

montrent, grâce à leur sensibilité de détection, qu'il peut s'agir de deux phénomènes différents: soit d'une absence d'amplification, soit d'une amplification préférentielle d'un allèle [49]. Les conséquences peuvent en être fâcheuses surtout lors de diagnostics concernant des maladies dominantes. Cela est moins grave lorsque l'on étudie des maladies récessives. En effet, cela conduit au mauvais diagnostic des embryons hétérozygotes qui seront, soit rejetés s'ils sont homozygotes pour la mutation, soit transférés s'il sont considérés comme normaux, ce qui n'aura pas de conséquences.

La méthode de lyse de la cellule étudiée et l'augmentation de la température de dénaturation de l'ADN lors des premiers cycles de PCR semblent diminuer de façon significative l'ampleur de ce phénomène. La lyse est réalisée dans une solution de KOH à 65°C pendant dix minutes et les premiers cycles de PCR sont réalisés en utilisant une température de dénaturation de 96°C plutôt que 94°C [50, 51].

Ray *et al.* (Londres, GB) ont montré que, quand deux mutations différentes peuvent être amplifiées avec la même paire d'oligonucléotides lors du premier cycle de PCR, l'ADO n'engendre pas d'erreur de diagnostic grave [30]. Un diagnostic fiable peut donc être obtenu pour plusieurs mutations dans la mesure où celles-ci sont situées à moins de 1000 pb et peuvent être coamplifiées.

• Reproductibilité et fiabilité

Les taux de reproductibilité et de fiabilité sont très similaires pour la PCR

et pour la FISH, compris entre 80% et 95% selon le locus, la mutation ou les chromosomes étudiés. Afin d'augmenter la fiabilité de la détermination du sexe des embryons, certains auteurs préconisent de prélever deux blastomères pour réaliser, sur l'un, une PCR et, sur l'autre, une FISH [20]. Il a déjà été clairement démontré que l'analyse séparée de deux blastomères par la même technique augmente considérablement la fiabilité du diagnostic [52]. Malheureusement, il n'est pas toujours possible de prélever deux blastomères sur un embryon sans lui porter atteinte. Quant aux difficultés liées à la biopsie du ou des blastomères, elles sont très limitées et ne sont que rarement mentionnées dans la littérature [17]. Une bonne pratique des micromanipulations permet de réaliser cette biopsie sans difficulté et toute personne possédant les techniques de micro-injection doit être capable de la réaliser.

Résultats

L'ensemble des centres pratiquant le DPI se réunissent une fois par an afin de réaliser un suivi des résultats et des progrès dans le domaine. Il est publié tous les ans un rapport de cette réunion dans le *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [53-55]. Les résultats présentés ici font référence au dernier rapport publié qui correspond à la réunion qui s'était tenue à Hambourg en juin 1995. Certains résultats ont été publiés depuis, résultats que nous avons ajoutés dans les différents tableaux. Le DPI est pratiqué par quatorze centres dans dix pays à travers le monde (Angle-

terre, USA, Belgique, Australie, Espagne, Suède, Hollande, Canada, Israël et Colombie); 197 cycles de stimulation ont été réalisés, ce qui a conduit à 171 transferts (86%), 50% grossesses (soit 25% par cycle, 29% par transfert et 34% par patiente) et 35 naissances d'enfants sains (voir *Tableau I*). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus lors de programmes de FIV classique, surtout si l'on tient compte du fait que dans un grand nombre de cas, un seul embryon peut être transféré.

Trois erreurs de diagnostic ont été rapportées: l'une a eu lieu lors de la première tentative de détermination du sexe à l'issue de laquelle un embryon mâle avait été transféré [10], et deux autres dans des tentatives de caractériser deux mutations différentes sur le gène *CFTR* [56]. Au vu de ces résultats et d'essais sur des cellules, il a été fortement conseillé de ne pas chercher à caractériser deux mutations différentes à partir d'une seule cellule [54, 57] avant d'avoir acquis une meilleure maîtrise de cette technologie. Rappelons qu'à l'heure actuelle, un diagnostic prénatal est systématiquement proposé pour confirmer un DPI.

Le DPI est principalement proposé pour des maladies liées au chromosome X; cela concerne les deux tiers des diagnostics qui ont été pratiqués, et repose sur la détermination du sexe des embryons. Les *Tableaux II* et *III* récapitulent l'ensemble des déterminations du sexe réalisées. Initialement ceux-ci étaient réalisés par PCR (*Tableau II*) en amplifiant une séquence d'ADN présente sur le chromosome Y. Actuellement on amplifie toujours, outre une

Tableau I

RÉCAPITULATION DE L'ENSEMBLE DES DIAGNOSTICS GÉNÉTIQUES PRÉIMPLANTATOIRES PRATIQUÉS À CE JOUR

Diagnostic	Patients	Cycles	Transferts	Grossesses	Accouchements	Nouveaux-nés
Détermination du sexe par PCR*	42	63	54	15	9	12
Détermination du sexe par FISH*	49	70	56	15	8	11
Mutations spécifiques	59	65	62	21	12	12
Total	150	198	171	51	29	35

* Un cas a été traité à la fois par PCR et par FISH (compté avec les PCR).

Tableau II

RÉCAPITULATION DES NAISSANCES APRÈS DÉTERMINATION DU SEXE DES EMBRYONS PAR PCR

Centres	Patients	Cycles	Transferts	Grossesses	Accouchements	Nouveau-nés
Hammersmith Hospital, GB	12	18	15	5	4	6
RGI, Chicago, USA*	6	16	13	5	1	1
Cornell, New York, USA	9	10	8	3	3	4
Genetics and IVF, Fairfax, USA	7	10	10	1	0	0
Cecolfes, Colombie	3	3	2	1	1	1
Academic Hospital, Bruxelles, Belgique	2	2	2	0	0	0
University of Adelaïde, Australie	1	2	2	0	0	0
University Hospital, Ontario, Canada	1	1	1	0	0	0
Jones Institute, Norfolk, USA	1	1	1	0	0	0
Total	42	63	54	15	9	12

*Un cas a été traité à la fois par PCR et par FISH (compté avec les PCR).

Tableau III

RÉCAPITULATION DES NAISSANCES APRÈS DÉTERMINATION DU SEXE DES EMBRYONS PAR FISH

Centres	Patients	Cycles	Transferts	Grossesses	Accouchements	Nouveau-nés
Hammersmith Hospital, GB	24	40	31	9	5	7
RGI, Chicago, IL, USA	5	7	4	4	1	1
Cornell, New York, USA	6	6	6	1	1	1
GIEPH, Barcelone, Espagne	4	5	6	1	1	2
Academic Hospital, Maastricht, Pays-Bas	4	4	2	0	0	0
Monash IVF, Melbourne, Australie	3	4	4	0	0	0
Universitet Göteborg, Suède	2	3	2	0	0	0
Academic Hospital, Bruxelles, Belgique	1	1	1	0	0	0
Total	49	70	56	15	8	11

Tableau IV

RÉCAPITULATION DES NAISSANCES APRÈS UN DIAGNOSTIC GÉNÉTIQUE PRÉIMPLANTATOIRE POUR DES MUTATIONS SPÉCIFIQUES

Diagnostic	Centres	Patients	Cycles	Transferts	Grossesses	Accouchements	Nouveau-nés
CF; LN	Hammersmith Hospital, UK	17	20	20	8	6	6
X-fragile; CF	Genetics and IVF, Fairfax, USA	19	14	13	2	0	0
CF; DMD	Academic Hospital, Bruxelles, Belgique	5	8	7	2	2	2
CF	University of Adelaïde, Australie	4	8	8	3	0	0
CF	Cornell, New York, USA	6	6	5	3	1	1
Tay-Sachs	Jones Institute, Norfolk, USA	4	5	5	1	1	1
Hémophilie	Cecolfes, Colombie	2	2	2	1	1	1
CF	RGI, Chicago, USA	1	1	1	1	1	1
RhD (typage sanguin)	Hadassah University Hospital, Israel	1	1	1	0	0	0
Total		59	65	62	21	12	12

CF: cystic fibrosis, mucoviscidose; LN: Lesh-Nyhan; DMD: Duchenne muscular dystrophy, myopathie de Duchenne; RhD: groupe D dans le système Rhésus.

séquence spécifique du chromosome Y, une autre séquence appartenant, soit au chromosome X, soit à un chromosome autosomique, afin d'inclure un contrôle interne d'amplification [11-14, 58-60]. L'autre méthode de prédilection pour la détermination du sexe est la FISH (*Tableau III*) qui concerne 50 % des cas publiés [17, 18, 22, 56, 60-62]. Le DPI, pour un tiers des cas, est aussi proposé pour des maladies monogéniques où c'est alors la mutation affectant le gène qui est caractérisée. Parmi celles-ci, il est proposé un DPI pour la mucoviscidose (mutation $\Delta F508$) [25, 47], la myopathie de Duchenne [27], le syndrome de Tay-Sachs [26], le syndrome de l'X fragile [55], l'hémophilie A [55] et le typage sanguin RhD [55] (voir *Tableau IV*). Actuellement, il est réalisé un DPI spécifique pour chaque type de mutation mais dans un proche avenir il devrait être possible, grâce à l'utilisation de séquences microsatellites polymorphes, d'avoir un test par syndrome et non plus par mutation. Cela devrait augmenter largement le nombre de couples demandeurs pour lesquels un test est réalisable.

Le DPI est aussi proposé pour diagnostiquer des aneuploïdies liées, soit à l'âge de la femme, soit à des échecs successifs de grossesse ou de FIV. Ces diagnostics sont réalisés, soit sur des blastomères, soit sur des globules polaires [3, 7, 23]. Le problème principal des détections des aneuploïdies provient de la pauvre qualité des sondes actuellement disponibles.

Notre souhait est que d'ici trois à cinq ans le DPI soit de pratique courante en France comme dans beaucoup d'autres pays. Ce vœu est d'autant plus raisonnable que le nombre de diagnostics disponibles augmente rapidement ■

TIRÉS À PART

S. Viville.

S. Viville

Assistant hospitalier universitaire. Service de biologie de la reproduction hôpitaux universitaires de Strasbourg et IGBMC 1, rue Laurent-Fries, BP163 67404 Illkirch CU de Strasbourg Cedex, France.

P. Ray

Étudiant en thèse, Human Embryology Laboratory, Institute of Obstetrics and Gynaecology, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, Londres W12 0NN, Grande-Bretagne.

B. Viville

Interne en gynécologie obstétrique. Service de gynécologie obstétrique hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France.

A. Handyside

Reader in mammalian embryology; Human Embryology Laboratory, Institute of Obstetrics and Gynaecology, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, Londres W12 0NN, Grande-Bretagne.

P. Gerlinger

Professeur des universités, praticien hospitalier, Service de biologie de la reproduction hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France.

Remerciements

Nous remercions le Dr Georges Imbert pour sa lecture critique de ce manuscrit.

Summary

Preimplantation genetic diagnosis: techniques and results

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) now represents an alternative to prenatal diagnosis for couples at high risk of having offspring affected with severe genetic diseases. It represents the major advantage to characterise the involved mutation before the implantation of the embryo, therefore avoiding the psychological consequences of an abortion. The realisation of a PGD involves in vitro fertilisation (IVF) and techniques derived from the molecular biology field such as the polymerase chain reaction (PCR) and fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). Using these techniques allows either the sex determination of embryos for X-linked diseases or the direct detection of mutations for diseases such as cystic fibrosis, Lesch-Nyhan syndrome and Tay-Sachs disease. We present the different techniques which have been successfully used and the results obtained by the 14 centres worldwide practising PGD.

Note ajoutée aux épreuves

Verlinsky *et al.* (Chicago, IL, USA) ont publié récemment une étude concernant le DPI d'aneuploïdies (chromosomes X; 18; 13/21) par FISH sur le premier et/ou le second globule polaire. Ces DPI ont été proposés à 193 femmes âgées de plus de 35 ans. Les résultats publiés font état de 12 naissances d'enfants sains, 18 grossesses en cours et 9 fausses couches pour 187 transferts, soit un taux de grossesses par transfert de 20 % [63].