HAL
open science

Microchimérisme et prédiction des complications de la grossesse chez les femmes primigestes

Érika Vigorito

To cite this version:

Érika Vigorito. Microchimérisme et prédiction des complications de la grossesse chez les femmes primigestes. Gynécologie et obstétrique. 2016. dumas-01417236

HAL Id: dumas-01417236

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01417236v1

Submitted on 15 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AIX MARSEILLE UNIVERSITE

Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

Microchimérisme et prédiction des complications de la grossesse chez les femmes primigestes

Etude rétrospective de février 2014 à mai 2015

Présenté et publiquement soutenu

Le 29 Avril 2016

Par

VIGORITO Erika
Née le 28.06.1992

Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Sage-Femme
Année universitaire 2015/2016

Membres du jury :

- Mme Balzing Marie-Pierre, Sage-femme cadre enseignante
- Mr Lafon Edouard, Maïeuticien
- Mme Lambert Nathalie, PhD INSERM UMRs1097 (Directrice de mémoire)

AIX MARSEILLE UNIVERSITE

Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

Microchimérisme et prédiction des complications de la grossesse chez les femmes primigestes

Etude rétrospective de février 2014 à mai 2015

VIGORITO Erika

28.06.1992

Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Sage-Femme

Année universitaire 2015-2016

Validation 1ère session 2016 :

Mention:

Validation 2ème session 2016:

Visa et tampon de l'école

Microchimérisme et prédiction des complications de la grossesse chez les femmes primigestes

Etude rétrospective de février 2014 à mai 2015

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce mémoire.

En premier lieux : Mme Nathalie LAMBERT (Directrice de mémoire) qui m'a guidée, encadrée, orientée, aidée et conseillée. Ses encouragements et sa disponibilité m'ont beaucoup soutenue.

A toutes les personnes qui m'ont transmis des informations, qui ont accepté de répondre à mes questions, qui m'ont donné de précieux conseils, pour leur collaboration à ce mémoire, je les remercie.

- Gabriel MARTIN (Etudiant en thèse)
- Pr. YEROKINE (Biologiste)
- Jacques VAN HELDEN (Statisticien de l'INSERM)
- Stéphane D'AMICO (Technicien en immunologie et biochimie),
- L'équipe de l'Hôpital Saint Joseph et tout particulièrement, le Dr. DESBRIERE (Chef de pôle), Mme COTRONIS (Sage-femme cadre des consultations et des GRE), Mr DONATO (Maïeuticien) et l'ensemble des secrétaires,
- Les enseignantes de l'EU3M, particulièrement Florence COMTE, Mylène DESCAMPS et Carole ZAKARIAN,
- Camille SOLIER (Sage-femme),
- Fanny LEFEBVRE (Responsable qualité Hôpital Saint Joseph).

Et enfin, je remercie mes chers parents pour leur soutien et leur écoute.

SOMMAIRE

Introduction page 1

I. L'Homme est une chimère page 1

II. Les complications de la grossesse page 3

III. Etats des connaissances sur le microchimérisme et les complications gestationnelles page 5

Matériel et méthode page 7

Résultats page 12

Analyse et discussion page 19

I. Analyse des résultats et discussion page 19

II. Perspectives d'ouverture page 22

Conclusion page 26

Glossaire page 27

Bibliographie page 28

Annexes page 34

INTRODUCTION

I. L'Homme est une chimère

Le mot chimérisme provient de la mythologie grecque où la chimère est une créature fantastique composée de plusieurs parties de différents animaux. Généralement, elle est représentée avec un corps de chèvre, une tête de lion et une queue de serpent (Figure 1).

Figure 1 *: Représentation d'une chimère*

En génétique, le chimérisme correspond à la présence de plusieurs génotypes différents dans un même organisme, sous diverses formes, cellules ou ADN. On distingue diverses sources de chimérisme que l'on peut qualifier de « iatrogène » ou de « naturel ».

Le chimérisme « iatrogène » peut s'observer lors de transplantations d'organes [1] ou encore lors de transfusions sanguines (Figure 2). Le chimérisme « naturel » fait référence à celui observé lors de la grossesse pour décrire la présence de cellules fœtales chez la mère venant d'un échange transplacentaire (Figure 2). On parle alors plutôt de ***micro*chimérisme (Mc)**, qui correspond au chimérisme en *petite quantité*. Cet échange est bidirectionnel entre la mère et son fœtus, apportant un Mc fœtal chez la mère et maternel chez l'enfant [2].

Il est à noter que toute grossesse, à terme ou non (interruption volontaire de grossesse, IVG, ou fausse couche spontanée précoce, FCS) laisse un Mc fœtal chez la mère [3]. Un Mc entre jumeaux lors des grossesses multiples monochoriales ou non est aussi possible [4, 5].

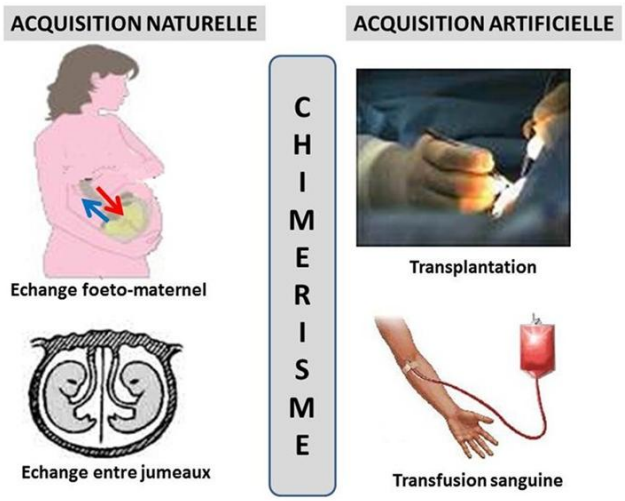


Figure 2 *: Source du chimérisme*

L'apparition de cet échange transplacentaire est précoce, dès 5 à 6 semaines d'aménorrhée (SA) [6], ce qui permet l'étude de l'ADN fœtal via un prélèvement de sang maternel. Dès 1979, Herzenberg et al. [7] met en évidence la présence de cellules fœtales dans le sang maternel par tri de cellules marquées par fluorescence (FACS, Fluorescence Activating Cell Sorting). Cependant la méthode la plus facile pour détecter du Mc fœtal chez une femme est basée sur l'amplification par PCR (Polymérase Chaine Réaction) d'ADN fœtal et ce, en amplifiant une séquence du chromosome Y chez des femmes portant un fœtus mâle [8]. Cependant cette méthode limite l'étude à du Mc fœtal masculin.

La présence de cellules fœtales dans le sang maternel au cours de la grossesse peut permettre un dépistage de trisomie 21 sans réaliser d'amniocentèse. Ce n'est qu'en 2013 que l'Hôpital Américain de Paris avec la collaboration du laboratoire d'analyses américain *Sequeman Laboratories* propose pour la première fois le diagnostic prénatal non invasif aux patientes porteuses d'un fœtus à haut risque de trisomie 21.

Plus étonnant, les cellules fœtales et maternelles persistent plusieurs années après l'accouchement chez leur hôte respectif [9, 10]. Tout individu, de par son passage *in utero*, reçoit donc des cellules appartenant à sa mère. Et toute femme ayant eu une grossesse à terme ou non est porteuse de cellules microchimériques fœtales.

Cette persistance à long terme pourrait avoir une influence sur la santé de l'hôte. Le rôle bénéfique ou néfaste du Mc reste encore très discuté. En effet il a d'abord été dépeint comme néfaste, pouvant être à l'origine de certaines maladies auto-immunes chez les femmes telles que la sclérodermie [11]. Ceci étant fondé sur la présence en quantité plus importante de Mc fœtal chez les sujets atteints par rapport aux sujets sains. Cela expliquerait aussi la prédominance des femmes dans ces maladies.

Cependant, le fait que ces cellules fœtales persistent des décennies suggère un phénotype de cellules souches, ayant la capacité de se différencier, de participer à la réparation tissulaire et d'accélérer le processus de cicatrisation chez leur hôte grâce à l'intervention de signaux spécifiques de recrutement diffusés lors de la lésion d'un tissu ou organe [12,13]. Ceci a été démontré dans des modèles murins [14] et suggéré chez l'Homme [15, 16].

II. Les complications de la grossesse

Les complications de la grossesse sont variées et ont un impact plus ou moins grave sur le déroulement de la grossesse et sur le devenir de la mère et du fœtus/nouveau-né. Ce mémoire se concentre sur les syndromes vasculo-reinaux, en particulier la pré-éclampsie et ses conséquences sur le fœtus, notamment le retard de croissance *in utero* (RCIU). Il se focalisera également sur les femmes ayants donné naissance à un nouveau-né de petit poids pour l'âge gestationnel (PAG).

Pourquoi la pré-éclampsie ? C'est l'une des premières causes de mortalité maternelle dans les pays développés [17], elle touche environ 5% des grossesses en France.

a. Qu'est-ce que la pré-éclampsie ?

C'est une anomalie placentaire due à un défaut de la placentation dont les manifestations cliniques apparaissent en général au 3ème trimestre de la grossesse. Elle se caractérise, selon la Haute Autorité de Santé (HAS), par l'association d'une hypertension artérielle ou HTA (une pression artérielle systolique ≥ 140mmHg et une pression artérielle diastolique ≥ 90mmHg) et d'une protéinurie supérieure à 0,3g/24h.

Son mécanisme d'installation est multifactoriel et reste encore mal connu. Les symptômes seraient la conséquence de deux voies partiellement indépendantes : une voie touchant certains gènes modulant le développement placentaire et une voie impliquant certains mécanismes résultant d'une anomalie de la disponibilité de l'oxygène. Ces deux voix seraient coordonnées précocement via le principe de tolérance immunitaire lors d'une grossesse (permettant l'installation d'une hémi-greffe dans l'utérus) [18].

Malgré la progression sur la connaissance de la physiopathologie de la pré-éclampsie, le seul vrai traitement est l'arrêt de la grossesse avec l'extraction fœtale et la délivrance [19]. Cependant, une étude de 2011 montre que l'utilisation de faibles doses d'aspirine débutée avant 16 SA réduirait le risque de pré-éclampsie sévère [20].

b. Petit poids pour l'âge gestationnel (PAG) et retard de croissance in-utéro (RCIU) : quelle différence ?

Le PAG est défini par un poids isolé inférieur au 10ème percentile (Estimation du poids fœtal in-utéro par échographie ou lié au poids de naissance). Alors que le RCIU, associé le plus souvent à un PAG, intègre une notion de dynamisme avec un défaut de croissance (arrêt ou infléchissement). Il faut noter que 80% des RCIU sont tardifs (3ème trimestre) et d'origine vasculaire (insuffisance placentaire).

III. Etat des connaissances sur la place du Mc dans les complications gestationnelles

Le Mc est découvert vraisemblablement pour la première fois en 1893 par Chistian G. Schmorl (1861-1932) [21], pathologiste allemand, qui suggère la présence de matériel génétique étranger de l'hôte dans les poumons d'une femme enceinte décédée des suites d'une éclampsie. Il ne put cependant pas conclure sur le lien entre éclampsie et Mc.

Une méta-analyse de 2014 [22], montre que la présence d'ADN fœtal circulant est en plus grande concentration dans le plasma des femmes pré-éclamptiques que de celles ayant eu une grossesse d'évolution normale, et ce avant l'apparition des signes cliniques. Elle ajoute aussi que c'est l'augmentation de cette concentration plasmatique en cours de grossesse qui est associée à l'apparition de cette pathologie. Le taux d'ADN circulant fœtal est corrélé à la sévérité de la pré-éclampsie [23]. Cette méta-analyse conclue sur le potentiel prédictif du taux d'ADN circulant fœtal de l'apparition de la pré-éclampsie, avant les symptômes cliniques. Cependant, les auteurs soulignent la nécessité d'une standardisation du protocole d'analyse et de quantification de l'ADN fœtal circulant, du fait d'une grande variabilité entre les différentes études. Enfin, outre l'ADN fœtal circulant, en 2013, une étude montre que les grossesses accompagnées d'une pré-éclampsie ont aussi, plus souvent, un microchimérisme ***cellulaire*** fœtal plus important que les grossesses sans complication [24].

Le mémoire de Camille Sollier, réalisé en 2015 dans l'équipe Microchimérisme de Nathalie Lambert, est une revue de la littérature afin d'étudier la cinétique du Mc au cours du temps [9]. Il est mis en évidence que le Mc est plus important dans les grossesses pathologiques que dans les grossesses d'évolution normale. Ce Mc est essentiellement stocké dans la moelle osseuse et son taux dans la circulation sanguine est plus important à long terme avec la présence d'évènements inflammatoires, auto-immuns, cancéreux ou lésionnels.

Après ces différents constats les questions suivantes se sont posées :

Pouvons-nous anticiper dès la 12ème semaine d'aménorrhée, par dosage du microchimérisme fœtal circulant :

i) une pré-éclampsie chez la femme primigeste ?

ii) un retard de croissance intra-utérin (RCIU) ou un petit poids pour l'âge gestationnel (PAG) chez le fœtus ou le nouveau-né ?

Pour répondre à ces interrogations, l'objectif principal est de montrer que la quantité de Mc fœtal circulant est plus importante dans les sérums des femmes enceintes pré-éclamptiques que dans celui des femmes enceintes sans complication et de même chez celles portant un fœtus avec un RCIU ou un PAG.

Pour cela, des sous-objectifs ont été dégagés : comparer le taux d'ADN total et masculin dans différents groupes de population et corréler le Mc fœtal avec les marqueurs sériques du premier trimestre de grossesse.

MATERIEL ET METHODE

1. Sélection des sujets

Sont collectés chaque année à la maternité de l'Hôpital Saint Joseph plus de 3000 tubes de sérum issu de femmes venant accoucher. La collection est faite pour les marqueurs sériques du premier trimestre, donc à 12 SA. L'un des deux tubes est un échantillon stocké non utilisé conservé pendant une durée d'un an (Annexe I).

La façon la plus simple de détecter du Mc fœtal circulant est d'amplifier une séquence d'un gène du chromosome Y chez des femmes primigestes, pour ne pas confondre le Mc fœtal actuel avec celui d'une précédente grossesse, et ayant donné naissance à un enfant mâle.

Parmi les 3200 sérums collectés de février 2014 à mai 2015, 104 sérums ont été sélectionnés au fil chronologique. Les sérums correspondent à ceux de femmes ayant donné naissance à un garçon, mais également et servant de contrôles, les sérums de femmes ayant donné naissance à une fille, répondant aux critères d'inclusion suivants :

- être primigestes *(pour ne pas confondre les sources microchimériques)*,
- avoir accouché à la maternité de Saint Joseph *(pour avoir le suivi de grossesse complet)*,
- avoir eu une grossesse unique *(pour simplifier la quantification de Mc)*.

Les critères de non inclusion étaient : les femmes ayant des sources iatrogènes de chimérisme : antécédent de transfusion ou de greffe. Un schéma récapitulatif résume notre processus de sélection (Figure 3).

Il n'a été décidé que tardivement d'inclure dans les sélections des sérums, ceux provenant de femme enceinte d'une fille et ayant une grossesse pathologique, servant de second groupe contrôle, d'où un effectif réduit à 14 pour ce groupe.

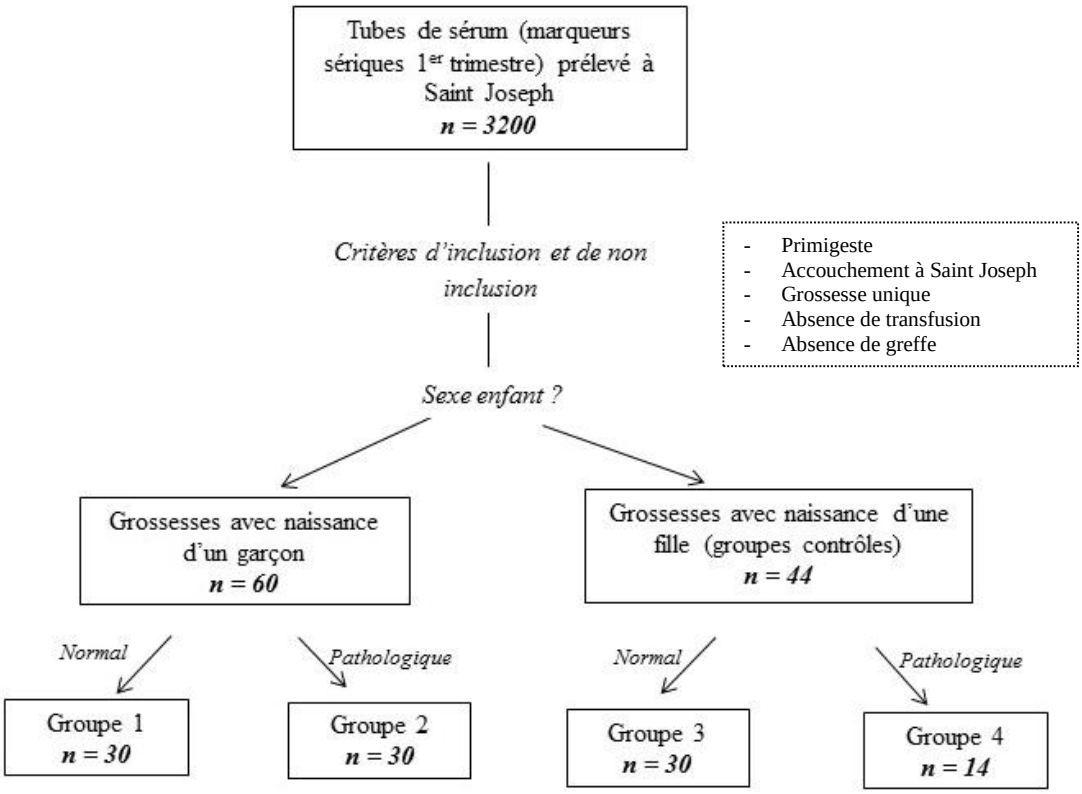


Figure 3 *: Diagramme de sélection des sujets*

Chez les patientes sélectionnées, nous avons relevé les données qui importaient à cette étude selon une grille de recueil établie au préalable (Annexe II).

Les différents groupes de population ont été définis selon certains critères présentés dans le tableau ci-dessous (Table 1).

Grossesses normales	Grossesses pathologiques
- absence de pré-éclampsie - absence d'hypertension artérielle (gestationnelle ou antérieure à la grossesse) - nouveau-né eutrophe	- présence d'une hypertension pendant la grossesse (plus ou moins présente en pré-conceptionnel) - présence d'une pré-éclampsie - et/ou un nouveau-né de petit poids pour l'âge gestationnel (PAG) < 10ème percentile - et/ou présence d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) < 3ème percentile

Table 1 : *Description des différents groupes de population*

Les groupes 2 et 4 ayant des grossesses pathologiques se divisent comme suit :

- Le groupe 2 :
  - Présence d'une pré-éclampsie dont 3 avec un RCIU associé (n=9)
  - HTA dont 1 avec un RCIU associé (n=4)
  - RCIU isolé (n=3)
  - PAG (n=14)
- Le groupe 4 :
  - Présence d'une pré-éclampsie (n =2)
  - HTA isolée (n=1)
  - PAG (n=11)

2. Extraction ADN

Afin de préparer les échantillons qui seront analysés par PCR quantitative, l'ADN a été extrait à partir de sérum avec le kit « High Pure template Preparation » (Roche, Basel, Switzerland) en suivant le protocole recommandé (Annexe III). Au total 500µL de sérum sont extraits et élués dans 100µL de tampon d'élution qui sera testé par PCR de la bêta-globine pour le dosage d'ADN total circulant et par PCR du chromosome Y pour le dosage d'ADN fœtal circulant.

3. PCR quantitative en temps réel

La quantification du Mc masculin est faite par PCR en temps réel grâce à l'amplification d'une séquence spécifique du chromosome Y, SRY. Le kit «LightCycler 480 Probes Master» est utilisé. Le système TaqMan pour SRY consiste à l'amplification d'une séquence du gène SRY avec 2 amorces sens (F) et anti-sens (R) (SRY-109F, 5'-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3' ; SRY-245R, 5'-CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3') et une sonde fluorescente (SRY-142T, 5'-(FAM) AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA(TAMRA)-3').

La quantification de l'ADN total circulant est réalisée par une amplification des gènes de la béta-globine, gène de ménage (présent chez tout individu) sur le chromosome 11. Le système TaqMan pour la béta-globine (HBB) consiste à l'amplification d'une séquence du gène HBB par 2 amorces sens (F) et anti-sens (R) (β-globin-354F, 5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3' ; β-globin-455R, 5'-CCT

TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3') et une sonde fluorescente (β-globin-402T, 5'-(FAM)AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG(TAMRA)-3').

Selon le principe Taqman, l'amplification est faite grâce à deux amorces et une sonde fluorescente (Figure 4). La sonde n'émet aucune fluorescence tant que le fluorophore est à une distance « d » de son Quencher (inhibiteur de fluorescence placé en 3' de la sonde). La Taq polymérase synthétise le brin complémentaire d'ADN et a la particularité d'avoir une fonction 5' exonucléase. Elle va donc libérer le fluorophore en position 5' de la sonde fluorescente. Le fait d'être libéré l'éloigne de son Quencher (distance « D ») et permet au fluorophore d'émettre sa fluorescence. C'est cette fluorescence qui est alors mesurée et quantifiée. Plus il y a de fluorescence, plus il y avait d'ADN au départ.

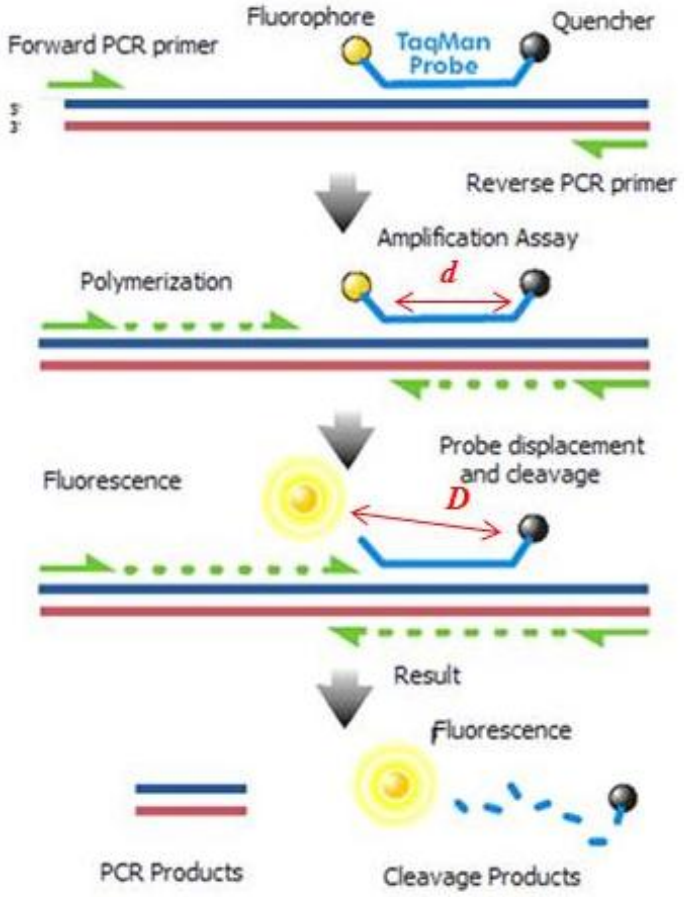


Figure 4 : *Principe d'une PCR TaqMan*

Les séquences des gènes SRY et β-globine sont obtenues à partir de la banque de données « GenBank Sequence Database » et leur numéro d'accession est respectivement : L08063 et U01317.

La PCR se fait dans un volume final de 20µL (incluant amorces et sondes). Les amorces et les sondes sont synthétisées par TibMolBiol (Berlin, Germany). Pour chaque PCR, 5µL de l'ADN extrait des sérums est utilisé. L'amplification de l'ADN est faite sur des plaques de 96 puits organisés par l'opérateur et selon un plan établi par ce dernier. Chaque échantillon est analysé en dupliqua pour la β-globine et en quadripliqua pour le SRY. Des puits de calibration et des contrôles négatifs sont ajoutés en parallèle, en dupliqua pour chaque analyse. Le facteur de conversion 6,6pg d'ADN par cellule, est utilisé pour exprimer les résultats en nombre de copies. Les résultats sont exprimés en copies ou génomes équivalents de cellules par mL de sérum (gEq/mL).

Les profils thermiques utilisés sont identiques pour les systèmes TaqMan β-globine et SRY : 2 min d'incubation à 50°C, un cycle de dénaturation de 10 min à 95°C, 40 cycle d'amplification de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C.

4. Analyse statistique

Les tests statistiques utilisés sont :

- Le test Mann Withney pour les évaluations de quantification de Mc
- Le test du Chi² pour les évaluations de fréquence de Mc
- Le test de Fisher (quand les effectifs théoriques sont inférieurs à 5 et les conditions d'applicabilité du test du Chi² ne sont plus satisfaites)
- Le test de Spearman pour les évaluations de corrélation
- Une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) pour évaluer la sensibilité et la spécificité des facteurs prédictifs (SRY, PAPP-A, β-HCG).

Les résultats obtenus sont considérés comme significatifs quand la p value est inférieure ou égale à 0.05.

RESULTATS

1. Description détaillée de la population étudiée

A la suite du recueil de données, certaines caractéristiques telles que le mode d'accouchement, le terme d'accouchement, le poids de naissance de l'enfant et l'âge maternel, ont été analysées dans chaque groupe (Table 2).

L'âge maternel n'est pas différent entre les différents groupes.

Le taux de césarienne est plus élevé chez les femmes ayant donné naissance à un garçon, avec une grossesse pathologique comparées aux femmes avec une grossesse normale (Groupe 2 versus Groupe 1, $p=0.052$). Cette différence n'est pas observée chez les femmes ayant eu une fille (Groupe 3 versus Groupe 4, $p=0.40$).

De plus, le Groupe 2 a plus souvent un accouchement avant terme ($p=0.052$) comparé au groupe de grossesses normales. Là encore, ce phénomène n'est pas observé chez les femmes ayant eu des filles.

Les marqueurs sériques classiquement testés à la 12ème SA, PAPP-A et β-HCG peuvent prédire les complications de grossesse. Une augmentation de PAPP-A est observée chez les femmes ayant eu une fille et dont la grossesse était normale comparées aux femmes ayant eu un garçon (Groupe 3 versus 1, $p=0.0024$). De plus, une diminution du taux de PAPP-A est observée dans les grossesses pathologiques des femmes ayant donné naissance à une fille (Différence marginale $p=0.056$). Il n'y a aucune différence notable entre les groupes pour la β-HCG.

Le poids de naissance du nouveau-né est statistiquement plus faible quand l'enfant est issu d'une grossesse pathologique quel que soit le sexe de l'enfant ($p<10^{-4}$ et $p<10^{-3}$, chez les femmes ayant donné naissance à un garçon et à une fille, respectivement). Il est aussi à noter une corrélation positive entre le poids de naissance du nouveau-né et le taux de PAPP-A (data non montrés Spearman $p=0.04$).

		Femmes ayant un garçon			Femmes ayant une fille		
		Groupe 1 n=30	Groupe 2 n=30	*P value*	Groupe 3 n=30	Groupe 4 n=14	*P value*
Age maternel (année)	Moyenne, [rang]	31 [24-42]	30 [19-47]	***ns***	29 [20-41]	29 [23-37]	***ns***
Mode d'accouchement	**Voie basse, n (%)**	**24 (80)**	**17 (57)**	***0.052***	**24 (80)**	**13 (93)**	***ns***
	spontanée, n	18	13		19	9	
	extraction instrumentale, n	6	4		5	4	
	Césarienne, n (%)	**6 (20)**	**13 (43)**	***0.052***	**6 (20)**	**1 (7)**	***ns***
	raison médicale, n	2	8		0	0	
	en cours de travail, n	4	5		4	1	
	pour refus voie basse, n	0	0		2	0	
Terme d'accouchement	Dépassement (> 41SA), n (%)	7 (23)	2 (6.6)		9 (30)	2 (14)	
	A terme (37 – 41 SA), n (%)	23 (77)	23 (77)		20 (67)	12 (86)	
	Prématurité (< 37SA), n (%)	**0 (0)**	**5 (16.7)**	***0.052***	**1 (3)**	**0 (0)**	***ns***
	Moyenne, [rang], SA	39.9 [37-41.7]	38.6 [26-41.4]		40.1 [35.4-42]	39.8 [38.3-41.7]	
Marqueurs sériques 1er trimestre	PAPP-A : moyenne, [rang]	0.91 [0.25-2.08]	1.13 [0.55-2.75]	***ns***	1.40 [0.37-3.29]	0.98 [0.49-1.84]	***0.056***
	β-HCG : moyenne, [rang]	1.18 [0.15-2.71]	1.38 [0.40-4.13]	***ns***	1.29 [0.42-2.87]	1.49 [0.37-7.24]	***ns***
Poids enfant (gramme)	Moyenne, [rang]	3426 [2700-4430]	2704 [455-3670]	$<10^{-4}$	3282 [2780-3410]	2842 [2450-3310]	$<10^{-3}$

Table 2 : Description des sujets sélectionnés

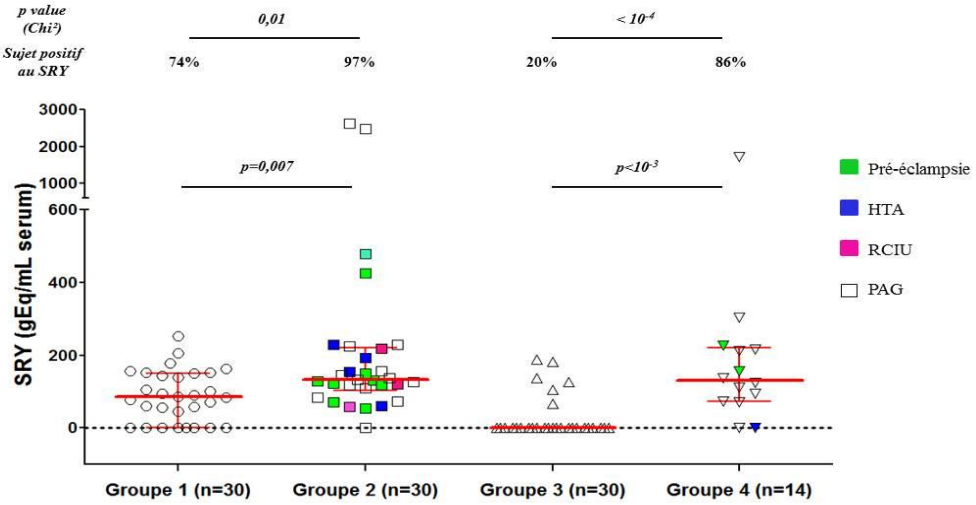
2. Analyse du Mc masculin chez les femmes primigestes

Dans les quatre groupes les taux d'ADN masculin ont été quantifiés. Les quantités sont comparées entre les groupes (Figure 5).

Les femmes ayant donné naissance à des garçons ont plus souvent du Mc masculin que celles ayant donné naissance à des filles (Groupe1+2 versus Groupe 3+4, 85% versus 41%, *p=0.000007*).

Chez les femmes ayant eu un garçon (Groupes 1 et 2), les quantités d'ADN masculin (SRY) sont statistiquement plus élevées chez celles ayant eu une grossesse pathologique (Groupe 2) comparées à celles ayant eu une grossesse normale (Groupe 1). Toutefois aucune pathologie ne se distingue comme ayant un Mc masculin statistiquement plus élevé, même si une tendance à des quantités plus élevées est vue dans la pré-éclampsie et PAG (carrés verts et transparents, Figure 5). La fréquence de femmes positives pour le Mc masculin est également plus élevée dans le groupe 2 (97% versus 74%, *p<0.01*).

Il est également observé la présence de Mc masculin dans les sérums de femme ayant donné naissance à une fille (Groupes 3 et 4), et cette présence est significativement plus importante chez celles ayant eu des complications de grossesse (Groupe 4), tant d'un point de vue fréquence de femmes positives pour SRY (86% versus 20%, $p<10^{-4}$) que d'un point de vue quantité par mL de sérum (Moyenne : 246 gE/mL versus 68 gE/mL, $p<10^{-3}$).



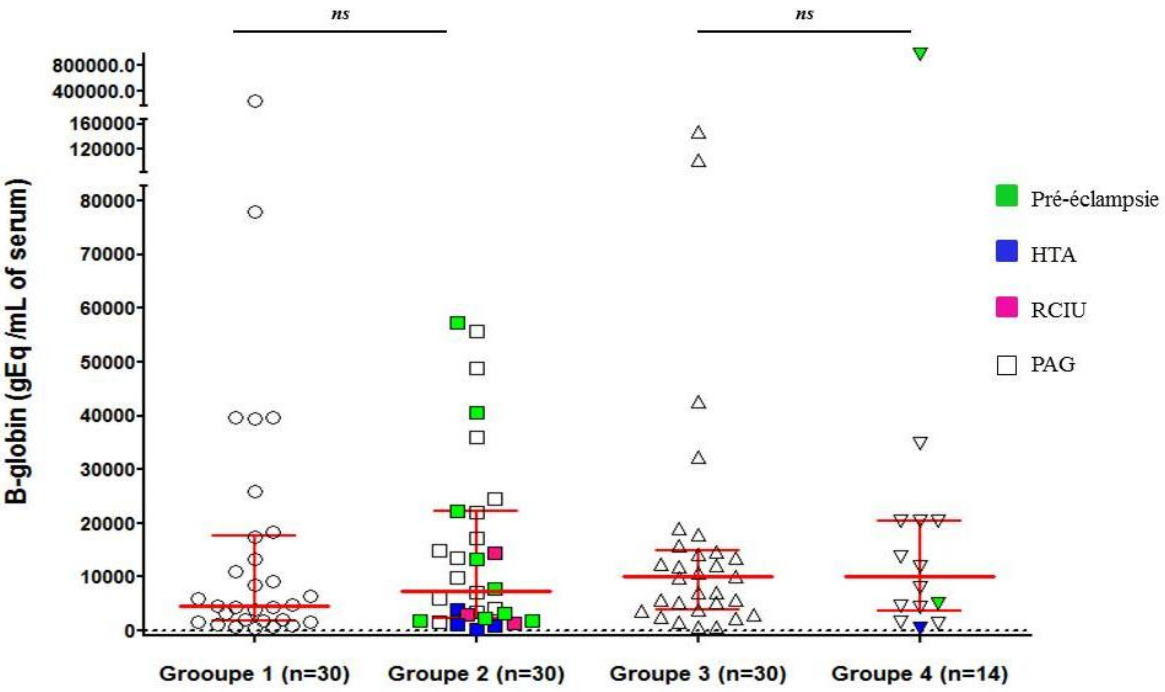
Mesure du taux d'ADN masculin circulant par PCR-quantitative (polymerization chain reaction) du gène présent sur le chromosome Y, SRY (Sex-determining Region of Y-chromosome). Les échantillons proviennent de sérum appartenant à des femmes primigestes entre 12 et 14 semaines d'aménorrhées, ayant eu soit un garçon (Groupe 1 et 2) soit une fille (Groupe 3 et 4) et/ou ayant eu une grossesse soit d'évolution normale (Groupe 1 et 3) soit se compliquant d'une pathologie placentaire ou d'un petit poids de naissance pour l'âge gestationnel (Groupe 2 et 4). Les barres rouges représentent la médiane avec les différents quartiles. Toutes les p values ont été calculées en utilisant le test statistique Mann Whitney et du Chi² par comparaison de Groupe 1 à Groupe 2 et de Groupe 3 à Groupe 4

Figure 5 : Taux d'ADN masculin (SRY) dans les différents groupes**.**

3. Pas de différence de quantité d'ADN circulant total (maternel et fœtal)

L'équipe a voulu savoir si la différence observée dans les quantités d'ADN fœtal circulant se retrouvait dans l'ADN total circulant dosé par PCR du gène de la bêta-globine (Figure 6). Ce dosage permet de tester la présence d'ADN qu'il soit maternel ou fœtal puisque l'amplification par PCR concerne un gène porté par le chromosome 11, gène de la bêta-globine, présent chez tout individu.

Aucune différence significative entre les groupes n'est observée (Figure 6).



Mesure du taux d'ADN total circulant par PCR-quantitative (polymerization chain reaction) du gène présent sur les chromosomes autosomaux, béta-globine. Les échantillons proviennent de sérum appartenant à des femmes primigestes entre 12 et 14 semaines d'aménorrhées, ayant eu soit un garçon (Groupe 1 et 2) soit une fille (Groupe 3 et 4) et/ou ayant eu une grossesse soit d'évolution normale (Groupe 1 et 3) soit se compliquant d'une pathologie placentaire ou d'un petit poids de naissance pour l'âge gestationnel (Groupe 2 et 4). Les barres rouges représentent la médiane avec les différents quartiles. Toutes les p values ont été calculées en utilisant le test statistique Mann Whitney par comparaison de Groupe 1 à Groupe 2 et de Groupe 3 à Groupe 4

Figure 6 : Taux d'ADN total (béta-globine) dans les différents groupes.

4. Corrélation entre quantités de Mc fœtal et marqueurs sériques du 1er trimestre

Des courbes de ROC ont été faites afin d'évaluer la valeur prédictive du Mc masculin et des taux de PAPP-A et β-HCG (Figure 7). Ces courbes montrent que le Mc masculin a une meilleure valeur prédictive du caractère pathologique de la grossesse (*p=0.0001*) que les taux de PAPP-A ou de β-HCG (Figure 7A). Ceci se retrouve également quand on fait la distinction entre les grossesses de garçons (Figure 7B) et les grossesses de filles (Figure 7C).

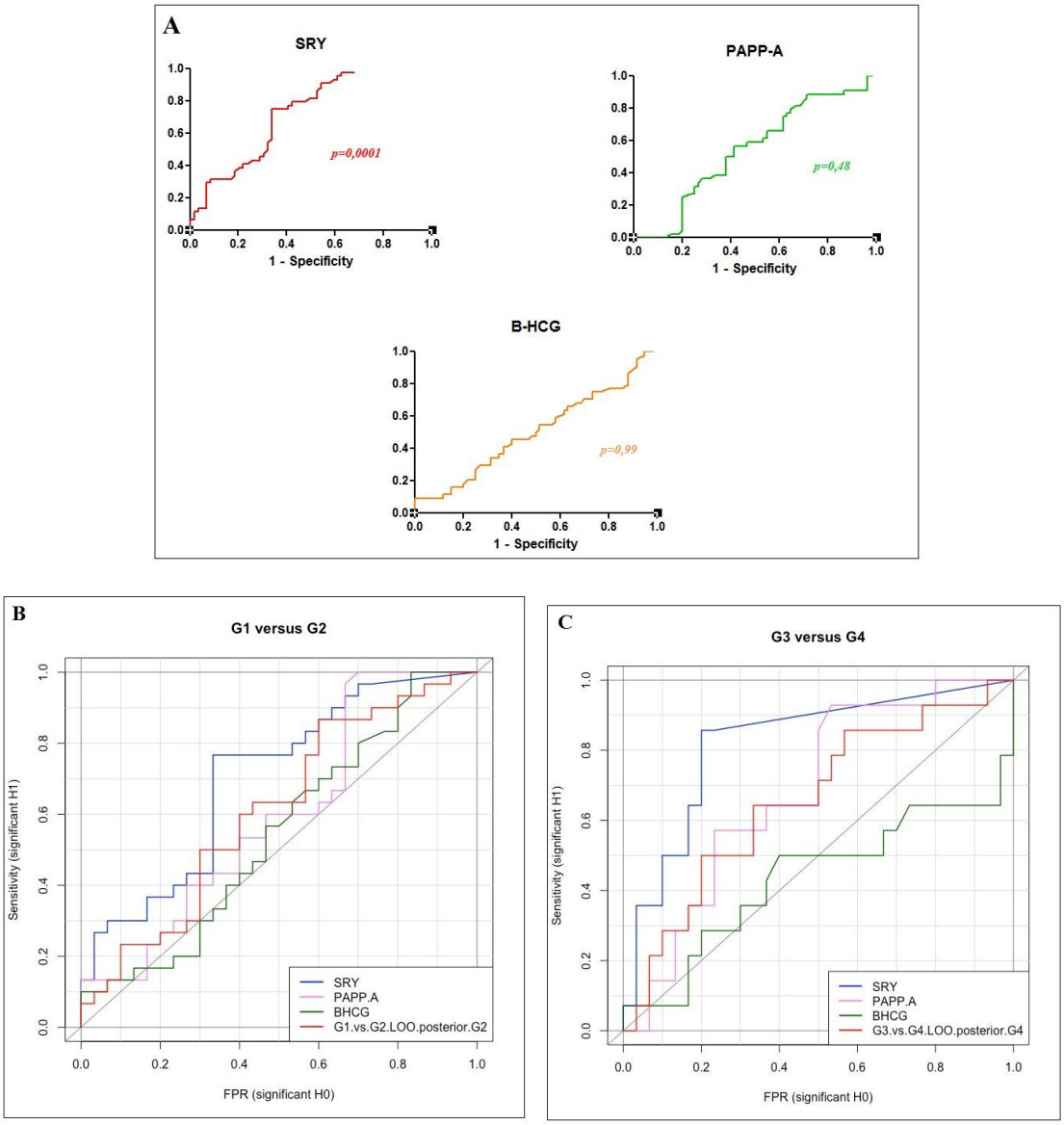


Figure 7 : Courbes de ROC

A- Grossesses normales versus Grossesses pathologiques tous sexes confondus, B- Grossesses normales (Groupe 1) versus Grossesses pathologiques (Groupe 2) (fœtus masculin), C- Grossesses normales (Groupe 3) versus Grossesses pathologiques (Groupe 4) (fœtus féminin)

5. Corrélation entre quantités de Mc fœtal et autres données cliniques

La Table 3 représente les effectifs et fréquences des femmes positives au Mc masculin dans les quatre groupes selon le mode d'accouchement, la prématurité de leur enfant et le poids du nouveau-né.

De façon générale, on observe plus souvent des accouchements par césarienne, une prématurité de l'enfant, ainsi qu'un faible poids à la naissance du nouveau-né chez les femmes positives pour le Mc masculin parmi celles ayant eu des complications de grossesse et un enfant mâle (Groupe 2 positive SRY), sans que cela soit statistiquement analysable puisque dans le groupe 2 seule une femme est négative pour SRY.

		Césarienne n (%)	Prématurité n (%)	Poids de naissance < 2500g n (%)
Groupe 1 n=30	SRY positif n=22	4 (18)	0 (0)	0 (0)
	SRY négatif n=8	2 (25)	0 (0)	0 (0)
Groupe 2 n=30	SRY positif n=29	**13 (45)**	**5 (17)**	**6 (21)**
	SRY négatif n=1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Groupe 3 n=30	SRY positif n=6	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	SRY négatif n=24	6 (25)	1 (4)	1 (4)
Groupe 4 n=14	SRY positif n=12	1 (8)	0 (0)	1 (8)
	SRY négatif n=2	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 3 : Mode d'accouchement, prématurité et poids de naissance de l'enfant et Mc masculin

Par contre, une corrélation négative existe entre les quantités d'ADN masculin et le poids de naissance de l'enfant (*p=0.005*) (Figure 8). La présence en plus grande quantité de Mc masculin prédit un faible poids à la naissance.

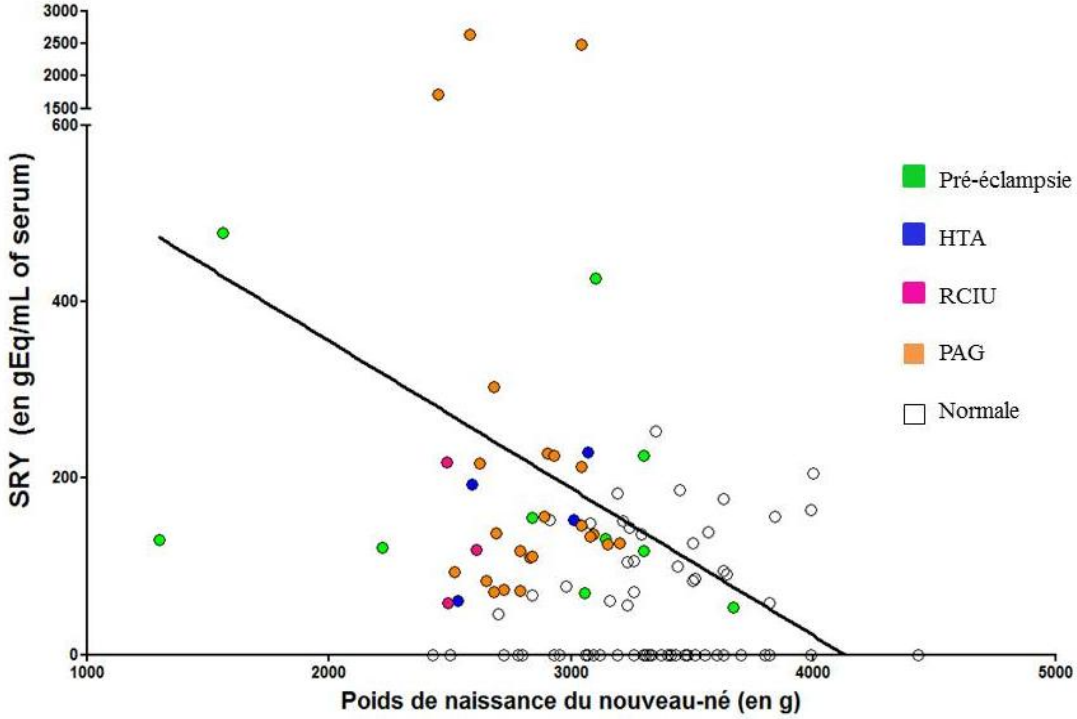


Figure 8 : Taux de Mc fœtal masculin (SRY) et du poids de naissance du nouveau-né

ANALYSE ET DISCUSSION

I. Analyse des résultats et discussion

a. Mc fœtal et grossesse pathologique

Dans cette étude, il a été montré que le Mc fœtal était plus important chez les femmes ayant une grossesse pathologique que chez celles ayant une grossesse d'évolution normale. Il est nécessaire de rappeler ici, que le caractère pathologique de la grossesse est défini par la présence d'une pré-éclampsie, ou d'une HTA gestationnelle ou pré-conceptionnelle, et/ou la présence d'un RCIU ou d'un PAG. Il a été impossible de faire une analyse individualisée des différentes pathologies du fait de leur nombre insuffisant pour chacune d'entre elles.

Toutefois, ces résultats sont en accord avec une méta analyse de 2014 [22] qui observe une concentration en ADN fœtal circulant plus élevée chez les femmes pré-éclamptiques et ce, avant l'apparition des signes cliniques. Il a été démontré que le taux de Mc fœtal est corrélé au degré de sévérité de la pré-éclampsie [23]. C'est aussi en accord avec une étude de 2013 portant sur le Mc fœtal cellulaire qui montre que la pré-éclampsie est associée à l'augmentation du trafic transplacentaire de génotype fœtal (Mc) et que le taux de Mc fœtal augmente avant les symptômes de la maladie.

Donc le Mc fœtal pourrait être utilisé dans la prédiction de la pré-éclampsie mais la standardisation des moyens de détection du Mc fœtal est un prérequis afin de limiter les variations dues aux différents modes de détection de l'ADN fœtal [22].

b. SRY et femmes primigestes ayant eu une fille

Dans l'analyse sur le groupe de femmes primigestes, ayant donné naissance à une fille (Groupe 3 et 4 = groupes contrôles), de façon étonnante 41% sont positives pour le Mc masculin. La présence d'ADN masculin peut s'expliquer de plusieurs manières.

La première explication est la non-déclaration par la patiente d'un antécédent de FCS ou d'IVG (omission volontaire ou FCS méconnue car passée inaperçue), dont le fœtus était masculin. En effet, Sato et al. [3] prouve que les femmes ayant fait une FCS ou une IVG au cours du premier trimestre de grossesse et dont le chorion était de sexe

masculin possèdent des cellules fœtales (Mc) dans leur circulation sanguine pendant le mois qui suit cette grossesse, puis disparaissent après 30 jours, car vraisemblablement stockées dans des organes maternels, notamment la moelle osseuse [9]. Le Mc est plus important chez celles ayant eu une IVG par aspiration comparé aux IVG médicamenteuses [25].

La seconde explication à la présence de SRY chez certaines femmes ayant eu des filles, peut être la présence d'un jumeau évanescent. En effet, dans une étude de 2010 [26], chez un patient de 40 ans ayant une maladie s'apparentant une sclérodermie, l'équipe de N. Lambert montre la présence de cellules féminines chez cet homme. Cette présence de Mc est confirmée par la présence d'un haplotype HLA différent de celui du patient, provenant le plus vraisemblablement d'une jumelle évanescente. Cette étude montre que la présence d'un(e) jumeau(e) évanescent(e) entraine un échange cellulaire entre fœtus avec une persistance à long terme de Mc gémellaire. Cette seconde explication reste la plus logique.

En effet, s'il y a eu un jumeau évanescent, cela signifie qu'il y a eu un problème au début de cette grossesse. Ce qui serait en accord avec le fait que dans ce mémoire, la présence de SRY, chez les femmes enceintes d'une fille, est plus importante chez celles ayant une grossesse pathologique et notamment chez celles ayant un petit poids pour l'âge gestationnel. En effet, les femmes ayant donné naissance à une fille, positives au Mc masculin, sont au nombre de 19 dont 10 ont un fœtus avec un PAG (53%). Ce pourrait être la conséquence d'une grossesse gémellaire non diagnostiquée. En effet une étude montre que l'enfant qui survit à une grossesse gémellaire avec un jumeau évanescent est plus à risque d'avoir un petit poids pour l'âge gestationnel qu'un enfant unique [27]. D'autre part, cette étude montre que plus la gestation du jumeau évanescent est courte, plus il y a de risque que le survivant soit de petit poids pour l'âge gestationnel. Ce qui expliquerait peut-être nos résultats et le fait qu'aucun jumeau n'ait été diagnostiqué, car disparut trop tôt pour être visible à l'échographie de la 12ème SA [27].

c. Pré-éclampsie et marqueurs sériques du premier trimestre

❖ ***PAPP-A***

La PAPP-A est une protéase intervenant dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire au cours de la grossesse. Elle est normalement décrite comme étant en quantité plus faible lorsque la grossesse est pathologique. De plus, une étude de 2011 faite par Ranta et al. [28] montre que ce marqueur est en quantité plus faible au premier trimestre de grossesse pour les grossesses où est survenue une pré-éclampsie. Dans ce mémoire, seule une différence marginale a été retrouvée entre les grossesses normales et pathologiques, chez les femmes ayant eu une fille (quantité plus faible chez les grossesses pathologiques).

Enfin, une étude montre que les femmes enceintes d'une fille ont un taux plus élevé de PAPP-A que celles enceintes d'un garçon [29]. Ce phénomène est aussi remarqué et statistiquement significatif dans ce mémoire.

❖ ***β-HCG***

De même, il a été démontré que les grossesses avec un fœtus féminin avaient un taux plus élevé de β-HCG [30-36], hormone permettant l'implantation placentaire et la poursuite de la grossesse, que celles avec un fœtus masculin. Cependant dans le cadre de ce mémoire, il n'a pas été retrouvé de différence significative entre le groupe des filles et des garçons en ce qui concerne le taux de β-HCG et le fait que la grossesse soit pathologique ou non. Alors qu'il devrait être plus élevé chez les grossesses pathologiques (Cours de maïeutique sur la pré-éclampsie C.Chau).

Ces points montrent que ces marqueurs, pourtant considérés comme un moyen de prédiction d'une pré-éclampsie, ne sont pas à eux seuls un moyen efficace et nécessitent l'apport d'autres éléments. C'est ce qui est mis en évidence, dans ce rapport, avec la quantification du Mc fœtal qui est un meilleur facteur prédictif que le dosage de PAPP-A et de β-HCG.

II. Perspectives d'ouverture

En dehors de l'intérêt de déceler très tôt pendant la grossesse une pathologie pour anticiper un traitement, il est aussi important de savoir que les complications peuvent avoir des répercussions à long terme sur la santé de la femme.

a. Antécédent de pré-éclampsie : impact à long terme

Des antécédents de complications de grossesse incluant la pré-éclampsie sont des facteurs de risque à développer plus tard une maladie auto-immune. Une étude sur une cohorte danoise [37], a évalué l'impact d'une grossesse menée à terme, d'une grossesse arrêtée et de la présence de certaines complications gestationnelles dont la pré-éclampsie, chez des femmes hospitalisées pour arthrite rhumatoïde entre 1977 et 2004. Cette étude montre que l'âge maternel à la naissance du 1er enfant et la parité ont un impact sur la survenue d'une maladie auto-immune. En effet, le risque de déclaration de la maladie est inversement proportionnel à l'âge lors de la naissance du premier enfant et au nombre d'enfants. De plus, elle démontre que le risque est augmenté quand la femme a eu, au cours de ses grossesses passées, une pré-éclampsie. Ceci est en reflet avec la diminution de l'adaptation immunitaire chez les femmes prédisposées à une arthrite rhumatoïde. Cela suggère un rôle du Mc fœtal dans l'étiologie des arthrites rhumatoïdes.

Enfin, une étude de 2011 montre pour la première fois que la présence de complication pendant la grossesse (comme de l'HTA, une pré-éclampsie, un RCIU ou un avortement) augmente le risque de développer une sclérodermie plus tard [38].

b. Mc fœtal : impact à long terme et outil de surveillance

Le Mc fœtal a longtemps été considéré comme délétère pour la santé future de la mère mais des études récentes suggèrent aussi un effet bénéfique à long terme. D'où le questionnement sur l'impact du Mc à long terme : bénéfique ou délétère ? [39]

En effet, il a été prouvé que le Mc fœtal est plus important chez les femmes atteintes d'une sclérodermie [11]. De plus, il a été observé, chez ces patientes, que la compatibilité HLA de classe II entre elle et son enfant était plus fréquente. Cette compatibilité HLA est associée à l'augmentation du Mc [40]. De plus, il a été montré

que, dans les thyroïdes des patientes atteintes d'un Hashimoto ou d'un goitre multi-nodulaire, le Mc était augmenté par rapport aux thyroïdes des femmes saines [41]. Cependant, le lien de causalité du Mc dans les maladies auto-immunes n'est pas certain. Par exemple, Bayes-Genis et al. [42], montrent du Mc fœtal dans le tissu cardiaque de femmes ayant une dilatation cardiaque idiopathique après leur grossesse, mais ne concluent pas sur le fait que le Mc est la cause ou la conséquence de cette pathologie.

De plus, chez les femmes atteintes d'un cancer du sein, il est montré que le taux de Mc cellulaire est diminué dans le sang alors qu'il est augmenté dans les tissus tumoraux [43]. La présence de Mc fœtal sanguin aurait alors un rôle protecteur contre le cancer du sein [44, 45]. De même, le Mc est diminué dans le sang des femmes atteintes d'un cancer du col de l'utérus [46]. Donc la cinétique du Mc cellulaire sanguin pourrait être un indicateur de la réponse aux traitements anti-cancéreux.

c. Outils actuels de prédiction pré-éclampsie

Les moyens de prédiction de la pré-éclampsie sont limités et peu fiables s'ils sont pris séparément. Ils se basent sur :

- L'anamnèse et les facteurs de risque
- Les marqueurs sériques du premier trimestre : la PAPP-A, la B-HCG, PIGF (facteur de croissance placentaire et endovasculaire), sFlt-1 (fraction soluble du récepteur membranaire VEGF), le ratio sFlt-1/PIGF [47-50]
- D'autres marqueurs contenus dans le sérum/plasma tel que : l'acide urique, la fibronectine plasmatique, le ratio calcium/créatinémie, des paramètres hémostatiques (antithrombine III ….), des marqueurs du stress oxydatif [51]
- Des éléments échographiques comme les dopplers des artères utérines.

De plus, une étude de 2008 montre que l'utilisation d'un index prédictif à trois niveaux (données anamnestiques, cliniques, biologiques et fonctionnelles) permet une identification des patientes à haut risque de pré-éclampsie avec une spécificité de 88% et une sensibilité de 88% [52]. Il serait donc intéressant de créer un score, dans le même esprit que le score trombo-embolique, afin d'identifier les patientes à haut risque de déclarer une pré-éclampsie, dans le but de mettre en place un protocole de traitement préventif. En effet, l'utilisation de faibles doses d'aspirine débutée avant 16SA réduirait le risque de pré-éclampsie sévère [20].

d. Détection du Mc fœtal : limites et perspectives

Détecter le Mc fœtal par amplification PCR d'une séquence d'un gène du chromosome Y (SRY) est certes la méthode la plus facile mais elle limite l'étude du Mc fœtal chez les femmes primigestes attendant un garçon, ou celles enceintes d'un garçon et ayant eu seulement des filles à leurs grossesses précédentes [8]. Pour inclure les femmes attendant une fille et distinguer les sources du Mc fœtal, il faudrait tester un autre polymorphisme distinct entre mère et enfant.

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé mon mémoire utilise une méthode basée sur le polymorphisme des gènes HLA entre mère et enfant (Figure 9). Cette méthode permet une étude beaucoup plus complète mais il est nécessaire de connaître le génotypage HLA de la mère et du fœtus. Or utiliser le polymorphisme HLA restait impossible dans le cadre de mon mémoire de maïeutique car cela aurait nécessité de recontacter chaque patiente pour laquelle l'échantillon de sérum a été collecté. Or cette étude est rétrospective et les patientes anonymisées. Mais cela indique de futures possibilités de projets.

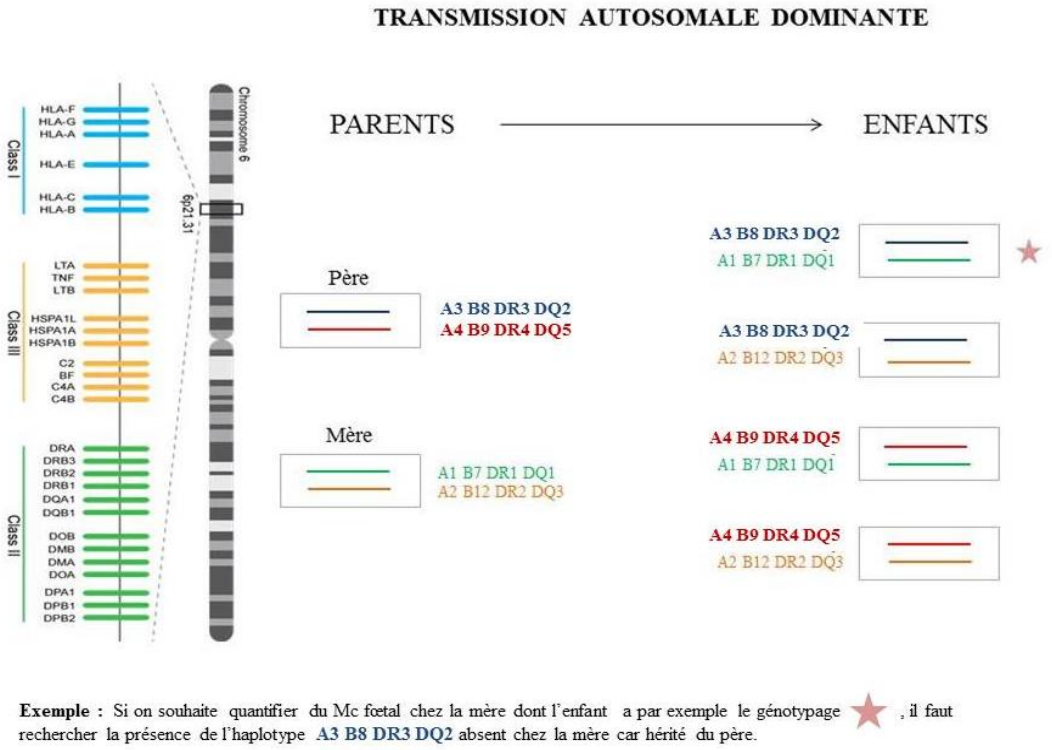


Figure 9 : *Polymorphisme HLA*

e. Place du Mc fœtal dans le dépistage et le diagnostic prénatal

Sa place est déjà discutée dans le cadre de la pré-éclampsie [22-24], mais beaucoup moins dans d'autres complications de la grossesse. Il serait intéressant au vue de son rôle dans la pré-éclampsie et dans d'autres syndromes placentaires, d'étudier son impact dans les diverses complications gestationnelles. Ce mémoire a permis d'analyser d'autres complications telles que la présence d'un PAG chez le nouveau-né. Il a montré que le Mc fœtal était plus important en cas de PAG comparé aux grossesses normales. Cependant, rien n'est retrouvé dans la littérature pour affirmer ou infirmer ce résultat, si ce n'est une étude qui montre que l'enfant qui survit à une grossesse gémellaire avec un jumeau évanescent est plus à risque d'avoir un PAG qu'un enfant unique [27]. Cette étude va dans le sens de nos résultats puisqu'un jumeau évanescent peut, non seulement laisser des séquelles microchimériques, mais également ralentir la prise de poids fœtal.

CONCLUSION

Montrer que la quantité de Mc fœtal circulant est plus importante dans les sérums des femmes enceintes pré-éclamptiques que dans celui des femmes enceintes sans complication et de même chez celles portant un fœtus avec un RCIU ou un PAG, était l'objectif principal de cette étude. Et donc, que le Mc fœtal permettrait d'anticiper une pré-éclampsie future, un RCIU ou un PAG.

Cette étude a montré que les femmes primigestes avec une grossesse pathologique ont un taux de Mc fœtal masculin plus élevé à 12 SA comparé à celles avec une grossesse normale, et ce peu importe le sexe de l'enfant. Cependant, elle a montré seulement une diminution de la quantité de PAPP-A chez les femmes ayant eu une fille entre les grossesses normales et pathologiques, et aucune différence entre les groupes pour le taux de β-HCG. Alors qu'ils sont classiquement considérés comme prédictifs de la survenue d'une pré-éclampsie future. Toutefois, l'analyse montre qu'une quantité élevée de Mc masculin a une bonne valeur prédictive du caractère pathologique de la grossesse. De plus, cette valeur prédictive est meilleur que celle évaluée par le taux de PAPP-A et de β-HCG. Le Mc fœtal masculin est également discriminant pour prédire un PAG et/ou un RCIU.

Le Mc fœtal, les antécédents de la patiente et divers marqueurs sériques pourraient s'intégrer dans un score afin d'identifier les femmes à haut risque de déclarer une pré-éclampsie et d'instaurer un traitement préventif. Mais pour cela il y a un prérequis qui est de standardiser le protocole de détection et de quantification du Mc fœtal.

GLOSSAIRE

ADN = Acide désoxyribonucléique

B-HCG = Bêta-Hormone Chorionique Gonadotrope

FCS = Fausse Couche Spontanée

HBB = Bêta-globine

HLA = Human Leucocyte Antigen (antigène des leucocytes humains)

HTA = Hypertension artérielle

IVG = Interruption Volontaire de Grossesse

Mc = Microchimérisme

NS = Non Significatif

PAG = Petit poids pour l'Age Gestationnel

PAPP-A = Pregnancy-Associated Plasma Protein-A

PCR = Polymérase Chaine Réaction

RCIU = Restriction de Croissance Intra-Utérine

SA = Semaine d'aménorrhée

SRY = Sex-determining Region of Y chromosome

BIBLIOGRAPHIE

[1] Lverson GM, Bianchi DW, Cann HM, Herzenberg LA. Detection and isolation of fetal cells from maternal blood using the fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Prenat Diagn 1981 1:61- 73*

[2] Lo Y, Lau M, Chan TK, Leung LY, Chang AM. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfert of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem 2000; 46:1301-9*

[3] Sato T, Fujimori K, Sato A, Ohto H. Microchimerism after induced or spontaneous abortion. *Obstet Gynecol 2008 ; 112 (September (3)) : 593-7*

[4] Jang JH[1], Jung H, Kim JH, Park WS, Kim SH. Blood chimerism in a dizygotic dichorionic pregnancy. *Korean J Lab Med. 2010 Oct;30(5):521-4. doi: 10.3343/kjlm.2010.30.5.521.*

[5] Lee HJ1, Yoon SC, Ko JM, Seong MW, Park SS, Choi JS, Oh SK. Monochorionic dizygotic twins with discordant sex and confined blood chimerism. *Eur J Pediatr. 2014 Sep;173(9):1249-52. doi: 10.1007/s00431-014-2312-8. Epub 2014 Apr 6.*

[6] Gänhirst D., Garritsen H.S.P., Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood. *Curr Op Gynecol Obstetr 7 1995: 103-108*

[7] Herzenberg LA, Bianchi DW, Schröder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant woman: detection and enrichment by fluorescence activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci USA 76 1979:1453–1455*

[8] Lambert NC, Stevens AM, Tylee TS, Erickson TD, Furst DE, Nelson JL. From the simple detection of microchimerism in patients with autoimmune diseases to its implication in pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep;945:164-71. Review.*

[9] **Sollier C**. Le microchimérisme fœtal est son maintien. Revue de la littérature. *[Mémoire maïeutique] Présenté à l'EU3M en avril 2015*

[10] **Gammill HS, Nelson JL.** Naturally acquired microchimerism. *Int J Dev Biol. 2010;54:531-543*

[11] **Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, et al.** Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet 1998 351:559–562*

[12] **Boyon C, Vinatier D.** Fetal microchimerism: self and non-self, finally who are we? *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction. 2011;40(5):387-98*

[13] **Nguyen Huu S, Dubernard G, Aractingi S, Khosrotehrani K.** Feto-maternal cell trafficking: a transfer of pregnancy associated progenitor cells. *Stem Cell Rev. 2006;2:111–116.63*

[14] **Khosrotehrani, K., Reyes RR, Johnson JL, Freeman RB, Salomon RN, Peters I, et al.** Fetal cells participate over time in the response to specific types of murine maternal hepatic injury. *Hum. Reprod. 2007 22: 654–661*

[15] **Khosrotehrani K, Bianchi DW.** Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue : a legacy in reserve. *J Cell Sci 2005; 118: 1559-63*

[16] **El-Badri NS1, Groer M.** The effect of pregnancy on production of maternal endogenous hematopoietic stem cells. *Biosci Hypotheses. 2008;1(2):100-102.*

[17] **Bouvier-Colle MH, Hatton F.** Mesure de la mortalité maternelle. Difficultés et évolution depuis vingt ans. In : Bouvier-Colle MH, Varnoux N, Bréat G, editor. *Les mortalités en France.* Paris : les éditions INSERM ; 1994. p.72

[18] **Rigourd V, T Chelbi S, Vaiman D**. Preeclampsia. *Médecine Sci MS. 2008 Dec;24(12):1017–9*

[19] Haddad B, Beaufils M, Bavoux F. Prise en charge de la pré-éclampsie. *Elsevier Masson 2015*

[20] Roberge S, Giguère Y, Villa P, Nicolaides K, Vainio M, Forest J-C, et al. Early administration of low-dose aspirin for the prevention of severe and mild preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Perinatol. 2012 Aug; 29(7):551–6.*

[21] Schmorl G. Pathologisch-Anatomische Untersuchungen Über Puerperal-Eklampsie. *Leipzig: Verlag FCW Vogel; 1893*

[22] Vlková B, Turňa J, Celec P. Fetal DNA in maternal plasma in preeclamptic pregnancies. *Hypertens Pregnancy. 2014 Oct 7;1–14.*

[23] Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstetr Gynaecol 2001; 184:414-19*

[24] Gammill HS, Aydelotte TM, Guthrie KA, Nkwopara EC, Nelson JL. Cellular fetal microchimerism in preeclampsia. *Hypertension. 2013 Dec 1 ; 62(6) : 1032-7*

[25] Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, et al. Cell-free DNA levels in maternal plasma after elective first trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril 2004 ; 81:638-44*

[26] Meric de Bellefon L, Heiman P, Kanaan SB, Azzouz DF, Rak JM, Martin M, et al. Cells from a vanished twin as a source of microchimerism 40 years later. *Lands Bioscience 2010*

[27] Pinborg A, Lidegaard O, La Cour Freiesleben N et Nyboe Andersen A. Vanishing twins : a predictor of small-for-gestational age in IVF singletons. *Human Reproduction Vol 22, No 10. August 2007 ; 2707-2714*

[28] Ranta JK, Raatikaien K, Romppaanen J, Pulkki K, Heinonen. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infant but not with placental abruption. *Eur J Obstet ynecol reprod Biol* 2011 jul ; 157 (1) 48-52

[29] Järvelä IY, Zackova T, Laitinen P, Ryynänen M et Tekay A. Effect of parity and fetal sex on placental and luteal hormones during early first trimester. *Prenatal Diagnosis 2012 ; 32:160-167*

[30] Byrne J, Warburton D. Male excess among anatomically normal fetuses in spontaneous abortions. *Am J Med Genet 1987; 26:605-11*.

[31] Illescas T, Fernandez C, Ortega D, de la Puente M, Coronado P, Montalvo J. Influence of gravidity and fetal gender on the value of screening variables in the first trimester of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2013; 167:14–7.*

[32] Spencer K. The influence of fetal sex in screening for Down syndrome in the second trimester using AFP and free b-hCG. *Prenat Diagn 2000; 20:648–51.*

[33] Larsen SO, Wojdemann KR, Shalmi AC, Sundberg K, Christiansen M, Tabor A. Gender impact on first trimester markers in Down syndrome screening. *Prenat Diagn 2002; 22:1207–8.*

[34] Yaron Y, Wolman I, Kupferminc MJ, Ochshorn Y, Many A, Orr-Urtreger A. Effect of fetal gender on first trimester markers and on Down syndrome screening. *Prenat Diagn 2001; 21:1027–30.*

[35] Spencer K, Ong CY, Liao AW, Papademetriou D, Nicolaides KH. The influence of fetal sex in screening for trisomy 21 by fetal nuchal translucency, maternal serum frees b-hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. *Prenat Diagn 2000; 20:673–5.*

[36] Cowans NJ, Stamatopoulou A, Maiz N, Spencer K, Nicolaides KH. The impact of fetal gender on first trimester nuchal translucency and maternal serum free b-hCG and PAPP-A MoM in normal and trisomy 21 pregnancies. *Prenat Diagn 2009; 29:578–81.*

[37] Jorgensen KT, Pedersen BV, Jacobsen S, Biggard RJ, Frisch M. National cohort study of reproductive risk factors for rheumatoid arthritis in Denmark : a role for hyperemesis, gestational hypertension and pre-eclampsia ? *Ann Rheum Dis 2010 ; 69 : 358-363*

[38] Van Wyk L, Van der Marel J, Schuerwegh AJ, Schouffoer AA, Voskuyl AE, Huizinga TW, Bianchi DW, Scherjon SA. Increased incidence of pregnancy complications in women who later develop scleroderma : a case control study. *Arthritis Res Ther. 2011 ; 13(6):R183. DOI:10.1186/ar3510.Epub 2011*

[39] Boyon C, Collinet P, Boulanger L, Rubod C, Luct JP, Vinatier D. Fetal microchimerism : benevolance or malevolence for the mother ? *Elsevier Ireland Ltd 2011*

[40] Nelson JL. HAL relationships of pregnancy, microchimerism and autoimmune disease. *J Reprod Immunol 2001;52 (October-November (1-2)):77-84*

[41] Klintschar M, Immel UD, Kehlen A et al. Fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis : a quantitative approach. *Eur J Endocrinol 2006; 154 (February (2)): 237-41*

[42] Bayes-Genis A, Roura S, Prat-Vidal C, et al. Chimerism and microchimerism of the human heart : evidence for cardiac regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2007; 4 (February (Suppl 1)): S40-5*

[43] Gadi VK, Malone KE, Guthrie KA, Porter PL, Nelson JL. Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLos ONE 2008;3(3): e1706*

[44] Frank R. Fetal microchimeric cells breast cancer. *JAMA 2004; 292: 1552-3*

[45] Gadi VK, Nelson JL. Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res 2007; 67(October (19)): 9035-8*

[46] Glimore GL, Haq B, Shadduck RK, Jasthy SL, Lister J. Fetal-maternal microchimerism in normal parous females and parous female cancer patients. *Exp Hematol 2008; 36(September (9)): 1073-7*

[47] RJ Levine et al. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *N Engl J Med, Feb 2004*

[48] Coolman M, Timmermans S, et al; Angiogenic and fibrinolytic factors in blood during the first half of pregnancy and adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gyneol 2012 119(6), 1190-200*

[49] Verlohren S, Herraiz I, et al. The sFlt-1/PIGF ratio in differents types of hypertensive pregnancy discorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet gynecol 2012, 206, 58.e1-8*

[50] Brown ZA, Schalekamp-Timmermans S, Tiemeier HW, Hofman A, Jaddoe VW, Steegers EA. Fetal sex specific differences in human placentation : a prospective cohort study. *Placenta 2014; 35: 359-64*

[51] Kharb S. Serum markers in pre-eclampsia. *Biomarkers, 2009 ; 14(6) : 395-400*

[52] Emonts P, Seaksan S, Seidel L, Thoumsin H, Brichant J-F, Albert A, et al. Détermination d'un index prédictif de la pré-éclampsie en pré-conceptionel et propositions thérapeutiques de prévention primaire. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod. 2008 Sep;37(5):469–76.*

ANNEXES

Annexe I : *Condition de prélèvement et d'acheminement des tubes de sérum*

Annexe II : *Grille de recueil de données*

Annexe III : *Protocole d'extraction d'ADN à partir de sérum*

ANNEXE I : CONDITION DE PRELEVEMENT ET D'ACHEMINEMENT DES TUBES DE SERUM

Extrait du Manuel de dépistage de a T21 fœtale par marqueurs sériques maternels – Processus analytiques – IMMUNOLOGIE – Version 01 – Décembre 2014 – du laboratoire de l'Hôpital de Saint Joseph (page 9 et 10 sur 14)

3. Conditions de prélèvement

Prélèvement veineux sur deux tubes secs de 7 ml avec ou sans gel. Attente de 30 minutes avant centrifugation à 3000 t/m pendant 10 minutes à 18°C.

Passage du tube en technique dans les 6 heures suivant la centrifugation sinon décantation et séparation du sérum dans un tube en plastique de 5 ml et conservation entre 4 et 8°C jusqu'à 72 heures avant analyse.

Si le prélèvement doit être conservé plus de 72 heures avant analyse, il doit être congelé à une température inférieure à -18°C.

4. Conditions d'acheminement

La majorité des prélèvements proviennent de patients externes prélevés au laboratoire. Le prélèvement est rapidement acheminé en technique après prélèvement.

Si la patiente est prélevée dans un service de soin, le prélèvement doit être acheminé au laboratoire dans un délai maximum de 4 heures après le prélèvement.

Deux tubes secs ou avec gel séparateur sont systématiquement prélevés. Un tube est destiné à la technique, l'autre tube sera affecté à la sérothèque. Les tubes sont centrifugés et analysés dans les quatre heures suivant le prélèvement. Si l'analyse n'est pas réalisée dans les quatre heures après le prélèvement, les tubes doivent être conservés au réfrigérateur entre 4 à 8°C pendant 72 heures. Au-delà de 72 heures, le prélèvement sera décanté et congelé à une température inférieure à -18°C.

Dans le cas où le prélèvement provient d'un laboratoire extérieur, celui-ci doit être acheminé après centrifugation et décantation à une température comprise entre 4 et 8°C dans les 72 heures après le prélèvement.

Si le délai est supérieur à 72 heures : congélation à une température inférieure à -18°C et transmission congelée au laboratoire.

Les patientes et les prélèvements peuvent être accueillis au laboratoire de 7 heures à 19 heures du lundi au vendredi et le samedi matin de 8H à 12 H.

ANNEXE II : GRILLE DE RECUEIL DE DONNEES

- ***Identification***

NOM : ……. Prénom : ……

Date de naissance : ……

- ***La grossesse***

La conception :

Grossesse spontanée ☐

Insémination artificielle avec sperme du conjoint ☐

Insémination artificielle avec sperme de donneur ☐

FIV ☐

FIV ICSI ☐

Don d'ovocyte ☐

Date de début de grossesse selon échographie : ……

Marqueurs sériques T1 (en MoM) : PAPP-A = …… et B-hCG = ……..

Déroulement de la grossesse :

Inclusion dans population :

Restriction de croissance intra-utérin (RCIU < 5ème percentile) ☐

Pré-éclampsie ☐

Sévérité : ……..

HTA isolée (chronique ou gravidique) ☐

Pathologie maternelle :

Pathologie pouvant augmenter le microchimérisme fœtal :

MAP ☐

Placenta prævia ☐

Métrorragie (MTR) ☐

Maladie auto-immune (exemple : Polyarthrite Rhumatoïde, Sclérodermie …) ☐

- ***L'accouchement***

Date de l'accouchement : …… Terme : …….

Mode d'accouchement et contexte :

Poids de naissance du bébé : ……

ANNEXE III : PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE SERUM

Before starting the purification, warm the **Elution Buffer** to +70°C.

1. To a nuclease-free 2 ml microcentrifuge tube :
   - Add 500 µl **serum**
   - Add 500 µl **Binding Buffer**
   - Add 100 µl **Proteinase K** (reconstituted)

   Mix immediately and incubate at +70°C for 10 min

2. Add 250 µl **Isopropanol** and mix well

3. Insert one High Pure Filter Tube into one Collection Tube

   Pipet the sample into the upper buffer reservoir of the Filter Tube

   Insert the entire High Pure Filter Tube assembly into a standard table-top centrifuge

   Centrifuge 1 min at 8000*g

4. After centrifugation :
   - Remove the Filter Tube form Collection Tube, discard the flowthrought and the Collection Tube
   - Combine the Filter Tube with a new Collection Tube
   - Add 500 µl **Inhibitor Removal Buffer** to the upper reservoir of to Filter Tube
   - Centrifuge 1 min at 8000*g

5. Remove the Filter Tube form Collection Tube, discard the flowthrought and the Collection Tube

   Combine the Filter Tube with a new Collection Tube

   Add 500 µl **Wash Buffer** to the upper reservoir of the Filter Tube

   Centrifuge 1 min at 8000*g and discard the flowthrought

6. Remove the Filter Tube form Collection Tube, discard the flowthrought and the Collection Tube

   Combine the Filter Tube with a new Collection Tube

   Add 500 µl **Wash Buffer** to the upper reservoir of the Filter Tube

   Centrifuge 1 min at 8000*g and discard the flowthrought

7. After discarding the flowthrought
   - Centrifuge the entire High Pure assembly for an additional 10s at full speed

     The extra centrifugation time ensures removal of residual Wash Buffer
   - Discard the Collection Tube

8. To elute the DNA :
   - Insert the Filter tube into a clean, sterile 1,5 ml microcentrifuge tube
   - Add 100 µl **prewarmed Elution Buffer** to the upper reservoir of the Filter Tube
   - Centrifuge the tube assembly for 1 min at 8000*g

RESUME

Microchimérisme et prédiction des complications de la grossesse chez les femmes primigestes :

Etude rétrospective de février 2014 à mai 2015

Objectif de l'étude : Comparer la quantité de microchimérisme fœtal dans les sérums de femmes primigestes à 12 semaines d'aménorrhée avec ou non une grossesse pathologique. Montrer que la présence élevée de microchimérisme fœtal permettrait d'anticiper dès 12 semaines d'aménorrhée la survenue d'une pré-éclampsie chez la femme, un RCIU ou un PAG chez le nouveau-né.

Matériel et méthode : Sélection de sérum de femmes primigestes ayant eu un garçon ou une fille et dont la grossesse fut normale ou pathologique (pré-éclampsie, hypertension artérielle, nouveau-né avec un RCIU ou un PAG). Quantification du taux d'ADN circulant total par PCR du gène de la β-globine (gène sur le chromosome 11 autosomal) et masculin via le gène SRY (gène du chromosome Y) dans quatre groupes de sérum. Corrélation des quantités de microchimérisme avec les marqueurs sériques du premier trimestre et les données cliniques de la grossesse et de l'accouchement.

Résultats : Le microchimérisme fœtal masculin est plus important chez les femmes ayant eu une grossesse pathologique. L'analyse montre que la présence de quantités élevées de microchimérisme masculin a une bonne valeur prédictive du caractère pathologique de la grossesse ($p<0.0001$). Dans l'étude cette valeur prédictive est meilleure que celle évaluée par les taux de PAPP-A et β-HCG. Le microchimérisme masculin est également prédictif d'un petit poids à la naissance.

Conclusion : La quantification du microchimérisme fœtal est un moyen prédictif de la pré-éclampsie et/ou du RCIU et/ou du PAG. Son utilisation comme facteur prédictif nécessite une standardisation du protocole de détection et quantification. Il serait intéressant d'insérer les valeurs de microchimérisme dans un score avec les antécédents de la patiente et divers marqueurs sériques, pour identifier les femmes à haut risque de pré-éclampsie afin de mettre en place un traitement préventif.

ABSTRACT

Microchimerism and pregnancy complications predictions amongst primigravid women:

Retrospective study from February 2014 to May 2015

Objective: To compare fetal microchimerism levels in serum from primigravid women at 12 weeks of amenorrhea (WA), with or without pathological pregnancies. To show that high levels of fetal microchimerism could predict emergence of preeclampsia in women, and/or intra-uterine fetal growth restriction (IUGR) and/or a small of gestational age (SGA) in newborns as early as 12 WA.

Methods: Selection of serum from primigravid women with a male or female offspring and with a healthy or pathological pregnancy (with preeclampsia, arterial hypertension, a newborn with IUGR or SGA). Quantification of total circulating DNA by quantitative PCR for β-globin (gene on autosomal chromosome) and for male DNA with SRY PCR (gene on the Y chromosome) on the 4 serum groups. Correlation of microchimerism quantities with 1st trimester serum markers as well as other pregnancy and delivery clinical data.

Results: Male fetal microchimerism is more prevalent in women with pathological pregnancies. The analysis shows that high quantities of male microchimerism have a good predictive value for pathological pregnancies ($p<0.0001$). In the current study this predictive value is better than PAPP-A and β-HCG rates. Male microchimerism can predict a small birth weight.

Conclusion: Fetal microchimerism quantification can help predicting preeclampsia and/or IUGR, and/or SGA. Using it as a predictive factor needs detection and quantification protocol standardization. Exploring the creation of a scoring system using microchimerism values in combination with serum markers and patient history to identify preeclampsia high risk women with the objective of preventive therapies would be an interesting follow through.